

COMPOSICIONES MODULADORAS DE LA SUBUNIDAD BETA E DE INHIBINA (INHBE) Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/246,084, presentada el 20 de septiembre de 2021, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/223,995, presentada el 21 de julio de 2021, la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/278,126, presentada el 10 11 de noviembre de 2021, la Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/285,143, presentada el 2 de diciembre, 2021, Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/287,578, presentada el 9 de diciembre de 2021, Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/321,799, presentada el 21 de marzo de 2022, Solicitud Provisional de EE. UU. N° 63/323,543, presentada el 25 de marzo de 2022 y Solicitud PCT No. PCT/US2022/037658, presentada el 20 de julio de 2022. El contenido completo de cada una de las 15 solicitudes anteriores se incorpora aquí como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Con la superación exitosa de muchas enfermedades infecciosas en la mayor parte del mundo, las enfermedades no transmisibles y, en particular, los trastornos metabólicos, se han convertido en un 20 importante peligro para la salud del mundo moderno. El aumento del consumo de comida rápida rica en calorías y baja en fibra y la disminución de la actividad física debido a los transportes mecanizados y al sedentarismo han provocado la propagación de trastornos metabólicos como el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares y otras discapacidades. De hecho, en los últimos años ha aumentado la incidencia 25 de sujetos con un trastorno metabólico, como el síndrome metabólico, que tienen una serie de condiciones de salud que los ponen en mayor riesgo de sufrir enfermedades cardíacas, diabetes, accidentes cerebrovasculares y otras enfermedades.

Los tratamientos actuales para los trastornos del metabolismo de los lípidos incluyen cambios en el estilo de vida, dietas, ejercicio y tratamiento con agentes, tales como agentes reductores de 30 lípidos, por ejemplo, estatinas y otros fármacos. Sin embargo, estas terapias y tratamientos a menudo están limitados por el cumplimiento, no siempre son efectivos, provocan efectos secundarios y dan lugar a interacciones entre medicamentos. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de tratamientos alternativos para sujetos que padecen trastornos metabólicos.

La subunidad beta E de la inhibina (INHBE) es miembro de la familia del factor de 35 crecimiento transformante β (TGF- β). Predominantemente expresada en el hígado, INHBE es una hepatoquina que se ha demostrado que se correlaciona positivamente con la resistencia a la insulina y el índice de masa corporal en humanos. El análisis cuantitativo por PCR en tiempo real también mostró un aumento en la expresión del gen *INHBE* en muestras de hígado de sujetos humanos resistentes a la insulina. Además, se demostró que la expresión del gen *Inhbe* estaba aumentada en los 40 hígados de un modelo animal reconocido en la técnica de un trastorno metabólico, es decir, diabetes

tipo 2, el modelo de ratón *db/db*. Se demostró que la inhibición de la expresión de *Inhbe* en ratones *db/db* suprime el aumento de peso corporal, atribuible a la disminución de la grasa en lugar de la masa magra.

Como se indicó anteriormente, existe una necesidad no satisfecha de tratamientos eficaces para trastornos metabólicos, tales como síndrome metabólico y enfermedades relacionadas, *por ejemplo*, diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares, tales como un agente que pueda modular selectiva y eficientemente, es decir, inhibir la expresión y/o actividad de INHBE.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona, *entre otras cosas*, un modulador que modula, es decir, inhibe, la expresión y/o actividad de la subunidad beta E de inhibina (INHBE) para tratar un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico.

En un aspecto, la presente invención proporciona un modulador de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE). El modulador puede ser un oligonucleótido que se dirige a INHBE, tal como un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) o un agente polinucleotídico antisentido; un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a INHBE, tal como un anticuerpo monoclonal anti-INHBE, o fragmento de unión a antígeno del mismo; una pequeña molécula; un ARN guía que efectúa la edición de ADAR, tal como un ARN guía que incluye una estructura de horquilla que se une a la enzima ADAR; o un ARN guía que efectúa la edición CRISPR.

En una realización, el agente polinucleotídico antisentido comprende de 4 a 50 nucleótidos contiguos, en donde al menos uno de los nucleótidos contiguos es un nucleótido modificado, y en donde la secuencia de nucleótidos del agente es complementaria en un 80% en toda su longitud con respecto a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8 o 10.

En una realización, la región equivalente es cualquiera de las regiones diana de SEQ ID NO:1 proporcionadas en la Tabla 4.

En una realización, el agente polinucleotídico antisentido comprende al menos 8 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas en la Tabla 3.

En una realización, sustancialmente todos los nucleótidos del agente polinucleotídico antisentido son nucleótidos modificados.

En una realización, todos los nucleótidos del agente polinucleotídico antisentido son nucleótidos modificados.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 10 a 40 nucleótidos.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 10 a 30 nucleótidos.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 18 a 30 nucleótidos.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 10 a 24 nucleótidos.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 18 a 24 nucleótidos.

5 En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 14 a 20 nucleótidos.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 14 nucleótidos.

En una realización, el agente polinucleótido antisentido tiene una longitud de 20 nucleótidos.

10 En una realización, el nucleótido modificado comprende un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que consiste en un resto de azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado 2'-O-alkilo y un resto de azúcar bicíclico.

15 En una realización, el resto de azúcar bicíclico tiene un grupo $(-CH_2-)_n$ que forma un puente entre los átomos de oxígeno 2' y de carbono 4' del anillo de azúcar, en el que n es 1 o 2 y en el que R es H, CH₃ o CH₃OCH₃.

En una realización, el nucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

En una realización, el nucleótido modificado comprende un enlace internucleósido modificado.

20 En una realización, el enlace internucleósido modificado es un enlace internucleósido fosforotioato.

En una realización, el modulador comprende una pluralidad de 2'-desoxinucleótidos flanqueados en cada lado por al menos un nucleótido que tiene un resto de azúcar modificado.

En una realización, el agente polinucleotídico antisentido es un gapmer que comprende un segmento hueco compuesto de 2'-desoxinucleótidos unidos colocados entre un segmento de ala 5' y 3'.

25 En una realización, el resto de azúcar modificado se selecciona del grupo que consiste en un resto de azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado 2'-O-alkilo y un resto de azúcar bicíclico.

En una realización, el segmento del ala 5' tiene de 1 a 6 nucleótidos de longitud.

En una realización, el segmento del ala 3' tiene de 1 a 6 nucleótidos de longitud.

30 En una realización, el segmento hueco tiene de 5 a 14 nucleótidos de longitud.

En una realización, el segmento del ala 5' tiene una longitud de 2 nucleótidos.

En una realización, el segmento del ala 3' tiene una longitud de 2 nucleótidos.

En una realización, el segmento del ala 5' tiene una longitud de 3 nucleótidos.

En una realización, el segmento del ala 3' tiene una longitud de 3 nucleótidos.

35 En una realización, el segmento del ala 5' tiene una longitud de 4 nucleótidos.

En una realización, el segmento del ala 3' tiene una longitud de 4 nucleótidos.

En una realización, el segmento del ala 5' tiene una longitud de 5 nucleótidos.

En una realización, el segmento del ala 3' tiene una longitud de 5 nucleótidos.

En una realización, el segmento hueco tiene 10 nucleótidos de longitud.

En una realización, el agente polinucleotídico antisentido comprende un segmento hueco que consta de desoxinucleótidos enlazados; un segmento de ala 5' que consta de nucleótidos enlazados; un segmento de ala 3' que consta de nucleótidos enlazados; en el que el segmento hueco está situado entre el segmento del ala 5' y el segmento del ala 3' y en el que cada nucleótido de cada segmento del ala comprende un azúcar modificado.

En una realización, el segmento hueco tiene una longitud de diez 2'-desoxinucleótidos y cada uno de los segmentos de ala tiene una longitud de cinco nucleótidos.

En una realización, el segmento hueco tiene una longitud de diez 2'-desoxinucleótidos y cada uno de los segmentos de ala tiene una longitud de cuatro nucleótidos.

En una realización, el segmento hueco tiene una longitud de diez 2'-desoxinucleótidos y cada uno de los segmentos de ala tiene una longitud de tres nucleótidos.

En una realización, el segmento hueco tiene una longitud de diez 2'-desoxinucleótidos y cada uno de los segmentos de ala tiene una longitud de dos nucleótidos.

En una realización, el resto de azúcar modificado se selecciona del grupo que consiste en un resto de azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado 2'-O-alquilo y un resto de azúcar bicíclico.

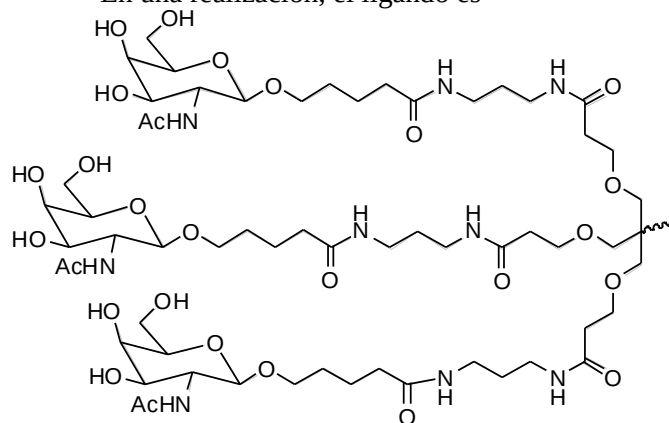
En una realización, todos los nucleótidos comprenden un enlace internucleósido modificado.

En una realización, el modulador comprende además un ligando.

En una realización, el modulador está conjugado con el ligando en el extremo 3'.

En una realización, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

En una realización, el ligando es



La presente invención también proporciona células que contienen cualquiera de los moduladores de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los moduladores de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede incluir un modulador en una solución no tamponada, por ejemplo, solución salina o agua, o la composición farmacéutica de la invención puede incluir el modulador en una solución tampón, por ejemplo, una solución tampón que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato o cualquier combinación de los mismos; o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, las composiciones

farmacéuticas comprenden un modulador y una formulación lipídica, por ejemplo, la formulación lipídica comprende un LNP o la formulación lipídica comprende un MC3.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la expresión y/o actividad de la subunidad beta E de inhibina (INHBE) en una célula. El método incluye poner en
5 contacto la célula con cualquiera de los moduladores de la invención o cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención, inhibiendo así la expresión y/o actividad del gen INHBE en la célula.

En una realización, la célula está dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno metabólico, tal como diabetes, o una enfermedad
10 cardiovascular, tal como hipertensión.

En determinadas realizaciones, la expresión y/o actividad de INHBE se inhibe al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %. En una realización, la inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE disminuye el nivel de proteína INHBE en el suero del sujeto en al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión y/o actividad de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE). El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los moduladores de la invención o cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención, tratando así al sujeto que tiene el trastorno que se beneficiaría de la
15 reducción en la expresión de INHBE.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión y/o actividad de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE). El método incluye administrar al sujeto una cantidad profilácticamente eficaz de cualquiera de los moduladores de la invención o cualquiera de
25 las composiciones farmacéuticas de la invención, previniendo así al menos un síntoma en el sujeto que padece el trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión de INHBE.

En una realización, la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz disminuye la relación cintura-cadera ajustada para el índice de masa corporal en el sujeto.

En determinadas realizaciones, el trastorno es un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un
30 trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal.

En algunas realizaciones, el trastorno asociado a INHBE es síndrome metabólico.

En algunas realizaciones, el trastorno asociado a INHBE es una enfermedad cardiovascular.

En algunas realizaciones, el trastorno asociado a INHBE es hipertensión.

En determinadas realizaciones, la administración del modulador al sujeto provoca una disminución de la acumulación de proteína INHBE en el sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona métodos para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una

cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los moduladores proporcionados en el presente documento, inhibiendo así la expresión y/o actividad de INHBE en el sujeto.

En una realización, el sujeto es humano.

En una realización, el modulador se administra al sujeto en una dosis de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg.

En una realización, el modulador se administra al sujeto por vía subcutánea.

En una realización, los métodos de la invención incluyen determinar además el nivel de INHBE en una muestra del sujeto.

En una realización, el nivel de INHBE en la(s) muestra(s) en cuestión es un nivel de proteína INHBE en una(s) muestra(s) de sangre o suero o tejido hepático.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención comprenden además administrar al sujeto un agente terapéutico adicional.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en insulina, un agonista del péptido 1 similar al glucagón, una sulfonilurea, una seglitinida, una biguanida, una tiazolidinediona, un inhibidor de alfa-glucosidasa, un inhibidor de SGLT2, un inhibidor de DPP- 4, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, una estatina y una combinación de cualquiera de los anteriores.

La presente invención también proporciona kits que comprenden cualquiera de los moduladores de la invención o cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención y, opcionalmente, instrucciones de uso. En una realización, la invención proporciona un kit para realizar un método para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en una célula poniendo en contacto una célula con un modulador de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en la célula. El kit comprende un modulador e instrucciones de uso y, opcionalmente, medios para administrar el modulador a un sujeto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un modulador, es decir, un inhibidor, del gen de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE) para tratar un trastorno asociado a la subunidad beta E de la inhibina (INHBE), por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal.

La siguiente descripción detallada divulga cómo hacer y usar composiciones que contienen moduladores para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE, así como composiciones, usos y métodos para tratar sujetos que se beneficiarían de la inhibición y/o reducción de la expresión y/o actividad de INHBE, por ejemplo, sujetos susceptibles o diagnosticados con un trastorno asociado a INHBE.

I. Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Además, cabe señalar que siempre que se mencione un valor o rango de valores de un parámetro, se pretende que los valores y rangos intermedios a los valores citados también formen parte de esta invención.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

El término "incluido" se utiliza en el presente documento para referirse, y se utiliza indistintamente con la frase "incluyendo, pero no limitado a".

El término "o" se utiliza en el presente documento para significar y se utiliza indistintamente con el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, "cadena sentido o cadena antisentido" se entiende como "cadena sentido o cadena antisentido o cadena sentido y cadena antisentido".

El término "aproximadamente" se utiliza en el presente documento para significar dentro de los rangos típicos de tolerancias en la técnica. Por ejemplo, "aproximadamente" puede entenderse como aproximadamente 2 desviaciones estándar de la media. En determinadas realizaciones, aproximadamente significa $\pm 10\%$. En determinadas realizaciones, aproximadamente significa $\pm 5\%$. Cuando aproximadamente está presente antes de una serie de números o un rango, se entiende que "aproximadamente" puede modificar cada uno de los números de la serie o rango.

Se entiende que el término "al menos", "no menos que", o "o más" anterior a un número o serie de números incluye el número adyacente al término "al menos", y todos los números o enteros posteriores que lógicamente podrían incluirse, como se desprende claramente del contexto. Por ejemplo, el número de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico debe ser un número entero. Por ejemplo, "al menos 19 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de 21 nucleótidos" significa que 19, 20 o 21 nucleótidos tienen la propiedad indicada. Cuando al menos está presente antes de una serie de números o de un rango, se entiende que "al menos" puede modificar cada uno de los números de la serie o rango.

Tal como se utiliza en el presente documento, "no más que" o "o menos" se entiende como el valor adyacente a la frase y los valores lógicos inferiores o enteros, como lógicos por contexto, hasta cero. Por ejemplo, un dúplex con un saliente de "no más de 2 nucleótidos" tiene un saliente de 2, 1 o 0 nucleótidos. Cuando antes de una serie de números o de un rango esté presente "no más de", se entiende que "no más de" puede modificar cada uno de los números de la serie o rango. Tal como se utiliza en el presente documento, los rangos incluyen tanto el límite superior como el inferior.

Como se usa en el presente documento, los métodos de detección pueden incluir la determinación de que la cantidad de analito presente está por debajo del nivel de detección del método.

En caso de conflicto entre un sitio diana indicado y la secuencia de nucleótidos de una cadena sentido o antisentido, la secuencia indicada tiene prioridad.

En caso de conflicto entre una secuencia y su sitio indicado en una transcripción u otra secuencia, la secuencia de nucleótidos citada en la especificación tiene prioridad.

Como se usa en el presente documento, un "modulador" es una molécula que disminuye o aumenta la expresión y/o actividad de INHBE.

En el contexto del presente documento, "subunidad beta E de inhibina", utilizado de manera intercambiable con los términos "INHBE", se refiere a un factor de crecimiento que pertenece a la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). El ARNm de INHBE se expresa predominantemente en el hígado (Fang J. *et al. Biochemical & Biophysical Res. Comm.* 1997; 231(3):655-61), e INHBE participa en la regulación del crecimiento y diferenciación de las células hepáticas (Chabicovsky M. *et al. Endocrinology.* 2003; 144(8):3497-504). INHBE también se conoce como cadena de inhibina beta E, activina beta E, subunidad de inhibina beta E, inhibina beta E y MGC4638.

La secuencia de un transcrito de ARNm de INHBE humano se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 1877089956 (NM_031479.5; SEQ ID NO: 1; complemento inverso, SEQ ID NO: 2). La secuencia del ARNm de INHBE de ratón se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 1061899809 (NM_008382.3; SEQ ID NO:3; complemento inverso, SEQ ID NO:4). La secuencia del ARNm de INHBE de rata se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 148747589 (NM_031815.2; SEQ ID NO: 5; complemento inverso, SEQ ID NO: 6). La secuencia predicha del ARNm de INHBE de Macaca mulatta se puede encontrar, por ejemplo, en el número de acceso de GenBank GI: 1622845604 (XM_001115958.3; SEQ ID NO:7; complemento inverso, SEQ ID NO:8).

Ejemplos adicionales de secuencias de ARNm de INHBE están disponibles a través de bases de datos disponibles públicamente, por ejemplo, GenBank, UniProt, OMIM y el sitio web del proyecto genoma *Macaca*.

Se puede encontrar más información sobre INHBE, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=INHBE.

El contenido completo de cada uno de los números de acceso de GenBank y los números de la base de datos de Gene mencionados anteriormente se incorporan aquí por referencia a partir de la fecha de presentación de esta solicitud.

El término INHBE, como se utiliza en el presente documento, también se refiere a variaciones del gen INHBE, incluidas variantes proporcionadas en la base de datos de SNP. Se han identificado numerosas variaciones de secuencia dentro del gen INHBE y se pueden encontrar, por ejemplo, en NCBI dbSNP y UniProt (ver, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=INHBE, cuyo contenido completo se incorpora al presente documento como referencia a partir de la fecha de presentación de esta solicitud.

Como se usa en el presente documento, "secuencia diana" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen INHBE, incluido el ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

En una realización, la porción diana de la secuencia será al menos lo suficientemente larga como para servir como sustrato para la escisión dirigida por ARNi en o cerca de esa porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen INHBE. En otra realización, la secuencia diana es una molécula de ácido nucleico con la que se hibrida específicamente un agente polinucleótido antisentido de la invención.

La secuencia diana puede tener una longitud de aproximadamente 19-36 nucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia diana puede tener aproximadamente 19-30 nucleótidos, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, la secuencia diana tiene una longitud de 19 a 23 nucleótidos, opcionalmente una longitud de 21 a 23 nucleótidos. También se contempla que formen parte de la divulgación rangos y longitudes intermedias a los rangos y longitudes citados anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe mediante la secuencia a la que se hace referencia utilizando la nomenclatura de nucleótidos estándar.

"G", "C", "A", "T" y "U" generalmente representan cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timidina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también puede referirse a un nucleótido modificado, como se detalla más adelante, o a un resto de reemplazo sustituto (ver, por ejemplo, Tabla 1). El experto sabe muy bien que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo pueden sustituirse por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta dicho resto de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como base puede emparejarse con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden sustituirse en las secuencias de nucleótidos de los oligonucleótidos presentados en la invención por un nucleótido que contenga, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, la adenina y la citosina en cualquier parte del oligonucleótido se pueden reemplazar con guanina y uracilo, respectivamente, para formar el emparejamiento de bases G-U Wobble con el ARNm diana. Las secuencias que contienen dichos restos de reemplazo son adecuadas para las composiciones y métodos presentados en la invención.

Los términos "ARNi", "agente de ARNi", "agente de ARNi", "agente de interferencia de ARN", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un agente que contiene ARN tal como se define ese término en el presente documento, y que media en la escisión dirigida de un ARN transcrito a través de una vía del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación específica de secuencia del ARNm mediante un proceso conocido como interferencia de ARN (ARNi). El ARNi modula, por ejemplo, inhibe la expresión de un gen INHBE en una célula, por ejemplo, una célula hepática dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En una realización, un agente de ARNi de la invención incluye un ARN monocatenario que interactúa con una secuencia de ARN diana, por ejemplo, una secuencia de ARNm diana INHBE, para dirigir la escisión del ARN diana. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que el ARN

bicatenario largo introducido en las células se descompone en ARNip mediante una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, una enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNbc en ARNs de interferencia cortos de 19-23 pares de bases con dos salientes característicos de bases 3' (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Los ARNip luego se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNip, permitiendo que la cadena antisentido complementaria guíe el reconocimiento de la diana (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Tras la unión al ARNm diana apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Por tanto, en un aspecto la invención se refiere a un ARN monocatenario (ARNip) generado dentro de una célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen diana, es decir, un gen INHBE. Por consiguiente, el término "ARNip" también se utiliza en el presente documento para referirse a un ARNi como se describe anteriormente.

En determinadas realizaciones, el agente de ARNi puede ser un ARNip monocatenario (ARNiss) que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm diana. Los agentes de ARNi monocatenario se unen a la endonucleasa RISC, Argonaute 2, que luego escinde el ARNm diana. Los ARNip monocatenarios generalmente tienen entre 15 y 30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y prueba de ARNip monocatenarios se describen en la patente estadounidense número 8.101.348 y en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en el presente documento se puede utilizar como un ARNip monocatenario como se describe en el presente documento o modificado químicamente mediante los métodos descritos en Lima *et al.*, (2012) *Celda* 150:883-894.

En determinadas realizaciones, un "ARNi" para su uso en las composiciones, usos y métodos de la invención es un ARN bicatenario y se denomina en el presente documento un "agente de ARN bicatenario", "molécula de ARN bicatenario (ARNbc)" "agente de ARNbc" o "ARNbc". El término "ARNbc" se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura dúplex que comprende dos cadenas de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, a las que se hace referencia como que tienen orientaciones "sentido" y "antisentido" con respecto a un ARN diana, es decir, un gen INHBE. En algunas realizaciones de la invención, un ARN bicatenario (ARNbc) desencadena la degradación de un ARN diana, por ejemplo, un ARNm, a través de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional denominado en el presente documento ARN de interferencia o ARNi.

En general, la mayoría de los nucleótidos de un oligonucleótido de la invención, por ejemplo, cada cadena de una molécula de ARNbc, son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en el presente documento, cada o ambas cadenas también pueden incluir uno o más no ribonucleótidos, *por ejemplo*, un desoxirribonucleótido o un nucleótido modificado. Además, tal como se utiliza en esta especificación, un "ARNi" o un "agente polinucleotídico antisentido" puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un ARNi o agente polinucleotídico antisentido puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos. Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido

modificado" se refiere a un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleotídico modificado o una nucleobase modificada, o cualquier combinación de los mismos. Por tanto, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o eliminación de, por ejemplo, un grupo o átomo funcional, a enlaces internucleosídicos, restos de azúcar o

nucleobases. Las modificaciones adecuadas para su uso en los agentes de la invención incluyen todos los tipos de modificaciones descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Cualquier modificación de este tipo, tal como se utiliza en una molécula de tipo ARNi, está abarcada por "ARNi" o "agente de ARNi" o "agente polinucleótido antisentido" a los efectos de esta especificación y reivindicaciones.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, la inclusión de un desoxinucleótido, si está presente dentro de un agente de ARNi o un agente polinucleótido antisentido, puede considerarse que constituye un nucleótido modificado.

La región dúplex de un agente de ARNi puede tener cualquier longitud que permita la degradación específica de un ARN diana deseado a través de una ruta RISC, y puede variar de aproximadamente 19 a 36 pares de bases de longitud, por ejemplo, aproximadamente 19-30 pares de bases de longitud. por ejemplo, aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36 pares de bases de longitud, tal como aproximadamente 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 pares de bases de longitud. En determinadas realizaciones, la región dúplex tiene una longitud de 19-21 pares de bases, por ejemplo, 21 pares de bases de longitud. También se contempla que formen parte de la divulgación rangos y longitudes intermedias a los rangos y longitudes citados anteriormente.

Las dos cadenas que forman la estructura dúplex de una molécula de ARNi pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos cadenas son parte de una molécula más grande y, por lo tanto, están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la estructura dúplex, la cadena de ARN enlaza se conoce como "bucle de horquilla". Un bucle en horquilla puede comprender al menos un nucleótido desapareado. En algunas realizaciones, el bucle en horquilla puede comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 o más nucleótidos desapareados. En algunas realizaciones, el bucle en horquilla puede tener 10 o menos nucleótidos. En algunas realizaciones, el bucle en horquilla puede tener 8 o menos nucleótidos desapareados. En algunas realizaciones, el bucle en horquilla puede tener de 4 a 10 nucleótidos desapareados. En algunas realizaciones, el bucle en horquilla puede tener de 4 a 8 nucleótidos.

Cuando las dos cadenas sustancialmente complementarias de un ARNbc están compuestas por moléculas de ARN separadas, esas moléculas no necesitan estar conectadas covalentemente, pero pueden estarlo. Cuando las dos cadenas están conectadas covalentemente por medios distintos a una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva formando la estructura dúplex, la estructura de conexión se denomina "enlace". Las cadenas de ARN pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. El número máximo de

pares de bases es el número de nucleótidos en la cadena más corta del ARNbc menos cualquier saliente que esté presente en el dúplex. Además de la estructura dúplex, un ARNi puede comprender uno o más salientes de nucleótidos. En una realización del agente de ARNi, al menos una cadena comprende un saliente 3' de al menos 1 nucleótido. En otra realización, al menos una cadena
5 comprende un saliente 3' de al menos 2 nucleótidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras realizaciones, al menos una cadena del agente de ARNi comprende un saliente 5' de al menos 1 nucleótido. En determinadas realizaciones, al menos una cadena comprende un saliente 5' de al menos 2 nucleótidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos. En otras realizaciones más, tanto el extremo 3' como el 5' de una cadena del agente de
10 ARNi comprenden un saliente de al menos 1 nucleótido.

En determinadas realizaciones, un agente de ARNi de la invención es un ARNbc, cada cadena del cual comprende de 19 a 23 nucleótidos, que interactúa con una secuencia de ARN diana, por ejemplo, un gen INHBE, para dirigir la escisión del ARN diana.

En algunas realizaciones, un ARNi de la invención es un ARNbc de 24-30 nucleótidos que
15 interactúa con una secuencia de ARN diana, por ejemplo, una secuencia de ARNm diana INHBE, para dirigir la escisión del ARN diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sobresaliente de nucleótidos" se refiere a al menos un nucleótido no apareado que sobresale de la estructura dúplex de un ARNi bicatenario. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una cadena de un ARNbc se extiende más allá del
20 extremo 5' de la otra cadena, o viceversa, hay un saliente de nucleótidos. Un ARNbc puede comprender un saliente de al menos un nucleótido; alternatively, el saliente puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al menos cinco nucleótidos o más. Un saliente de nucleótido puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluido un desoxinucleótido/nucleósido. Los salientes pueden estar en la
25 cadena sentido, en la cadena antisentido o en cualquier combinación de las mismas. Además, los nucleótidos de un saliente pueden estar presentes en el extremo 5', en el extremo 3' o en ambos extremos de una cadena sentido o antisentido de un ARNbc.

En una realización, la cadena antisentido de un ARNbc tiene 1-10 nucleótidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, sobresalientes en el extremo 3' o el extremo 5'. En una
30 realización, la cadena sentido de un ARNbc tiene 1-10 nucleótidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, sobresalientes en el extremo 3' o el extremo 5'. En otra realización, uno o más de los nucleótidos en el saliente se reemplazan con un nucleósido tiofosfato.

En determinadas realizaciones, la cadena antisentido de un ARNbc tiene 1-10 nucleótidos, por ejemplo, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, por ejemplo, un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, que
35 sobresalen en el extremo 3' o en el extremo 5'. En una realización, la cadena sentido de un ARNbc tiene de 1 a 10 nucleótidos, por ejemplo, un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, que sobresale en el extremo 3' o el extremo 5'. En otra realización, uno o más de los nucleótidos en el saliente se reemplazan con un nucleósido tiofosfato.

En ciertas realizaciones, la cadena antisentido de un ARNbc tiene 1-10 nucleótidos, por
40 ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, sobresalientes en el extremo 3' o el extremo 5'. En

determinadas realizaciones, el saliente de la cadena sentido o de la cadena antisentido, o ambas, puede incluir longitudes extendidas superiores a 10 nucleótidos, por ejemplo, 1-30 nucleótidos, 2-30 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-25 nucleótidos, 10 -20 nucleótidos, o 10-15 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, un saliente extendido está en la cadena sentido del dúplex. En determinadas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 3' de la cadena sentido del dúplex. En determinadas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 5' de la cadena sentido del dúplex. En determinadas realizaciones, hay un saliente extendido en la cadena antisentido del dúplex. En determinadas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 3' de la cadena antisentido del dúplex. En determinadas realizaciones, está presente un saliente extendido en el extremo 5' de la cadena antisentido del dúplex. En ciertas realizaciones, uno o más de los nucleótidos en el saliente extendido se reemplazan con un nucleósido tiofosfato. En ciertas realizaciones, el saliente incluye una porción autocomplementaria de modo que el saliente es capaz de formar una estructura de horquilla que es estable en condiciones fisiológicas.

"Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos desapareados en ese extremo del agente de ARN bicatenario, es decir, ningún nucleótido saliente. Un agente de ARN bicatenario de "extremos romos" es bicatenario en toda su longitud, es decir, no sobresale ningún nucleótido en ninguno de los extremos de la molécula. Los agentes de ARNi de la invención incluyen agentes de ARNi sin nucleótidos salientes en un extremo (es decir, agentes con un saliente y un extremo romo) o sin nucleótidos salientes en ninguno de los extremos. En la mayoría de los casos, una molécula de este tipo será bicatenaria en toda su longitud.

El término "cadena antisentido" o "cadena guía" se refiere a la cadena de un ARNi, por ejemplo, un ARNbc, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana, por ejemplo, un ARNm INHBE.

Como se usa en el presente documento, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la cadena antisentido de un agente de ARNbc o la región de un agente polinucleótido antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia diana, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos INHBE, como se define en el presente documento. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los desemparejamientos pueden ocurrir en las regiones internas o terminales de la molécula.

Generalmente, los desajustes más tolerados se encuentran en las regiones terminales, por ejemplo, dentro de 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' o 3' del ARNi. En algunas realizaciones, un agente de ARN bicatenario o un agente polinucleotídico antisentido de la invención incluye un desajuste de nucleótidos en la cadena antisentido. En algunas realizaciones, la cadena antisentido del agente polinucleotídico antisentido del agente de ARN bicatenario de la invención incluye no más de 4 desapareamientos con el ARNm diana, por ejemplo, la cadena antisentido incluye 4, 3, 2, 1 o 0 desapareamientos con el ARNm diana. En algunas realizaciones, el agente de ARN bicatenario de cadena antisentido de la invención incluye no más de 4 desapareamientos con la cadena sentido, por ejemplo, la cadena antisentido incluye 4, 3, 2, 1 o 0 desapareamientos con la cadena sentido. En algunas realizaciones, un agente de ARN bicatenario de la invención incluye un desajuste de nucleótidos en la cadena sentido. En algunas realizaciones, la cadena sentido del agente de ARN

bicatenario de la invención incluye no más de 4 desemparejamientos con la cadena antisentido, por ejemplo, la cadena sentido incluye 4, 3, 2, 1 o 0 desemparejamientos con la cadena antisentido. En algunas realizaciones, el desajuste de nucleótidos está, por ejemplo, dentro de 5, 4, 3 nucleótidos desde el extremo 3' del ARNi. En otra realización, el desajuste de nucleótidos está, por ejemplo, en el nucleótido terminal 3' del agente de ARNi. En algunas realizaciones, las discrepancias no están en la región de la semilla.

Por lo tanto, un agente de ARNi o un agente polinucleotídico antisentido como se describe en el presente documento puede contener una o más coincidencias erróneas con la secuencia diana. En una realización, un agente de ARNi o un agente polinucleotídico antisentido como se describe en el presente documento contiene no más de 3 coincidencias erróneas (es decir, 3, 2, 1 o 0 coincidencias erróneas). En una realización, un agente de ARNi o un agente polinucleotídico antisentido como se describe en el presente documento contiene no más de 2 desapareamientos. En una realización, un agente de ARNi o un agente polinucleotídico antisentido como se describe en el presente documento contiene no más de 1 desempareamiento. En una realización, un agente de ARNi o un agente polinucleotídico antisentido como se describe en el presente documento contiene 0 coincidencias erróneas. En determinadas realizaciones, si la cadena antisentido del agente de ARNi o agente polinucleotídico antisentido contiene coincidencias erróneas con la secuencia diana, la coincidencia errónea puede restringirse opcionalmente para que esté dentro de los últimos 5 nucleótidos del extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, en tales realizaciones, para un agente de ARNi de 23 nucleótidos, la cadena que es complementaria a una región de un gen INHBE, generalmente no contiene ningún desajuste dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en el presente documento o métodos conocidos en la técnica se pueden usar para determinar si un agente de ARNi o un agente polinucleotídico antisentido que contiene una falta de coincidencia con una secuencia diana es eficaz para inhibir la expresión de un gen INHBE. Consideración de la eficacia de agentes de ARNi o agentes polinucleotídicos antisentido con desajustes para inhibir la expresión de un gen INHBE es importante, especialmente si se sabe que la región particular de complementariedad en un gen INHBE tiene una variación de secuencia polimórfica dentro de la población.

El término "cadena sentido" o "cadena pasajera", como se usa en el presente documento, se refiere a la cadena de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la cadena antisentido tal como se define ese término en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "sustancialmente todos los nucleótidos están modificados" están modificados en gran medida, pero no en su totalidad, y no pueden incluir más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados.

Como se usa en el presente documento, el término "región de escisión" se refiere a una región que está ubicada inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio de la diana en el que se produce la escisión. En algunas realizaciones, la región de escisión comprende tres bases en cada extremo e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas realizaciones, la región de escisión comprende dos bases en cada extremo e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas realizaciones, el sitio de escisión ocurre específicamente en el sitio unido por los

nucleótidos 10 y 11 de la cadena antisentido, y la región de escisión comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementario", cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura dúplex bajo ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, TUBOS 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas seguido de lavado (ver, por ejemplo, "Clonación molecular: un manual de laboratorio, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Pueden aplicarse otras condiciones, como las condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Las secuencias complementarias como se describen en el presente documento incluyen el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de una o ambas secuencias de nucleótidos. Estas secuencias pueden denominarse "totalmente complementarias" entre sí en el presente documento. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 5, 4, 3 o 2 pares de bases no coincidentes tras la hibridación para un dúplex de hasta 30 pares de bases, conservando al mismo tiempo la capacidad de hibridar en las condiciones más relevantes para su aplicación final, por ejemplo, inhibición de la expresión génica, in vitro o in vivo. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos están diseñados para formar, tras la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, dichos salientes no se considerarán como desajustes con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, aún puede denominarse "totalmente complementario" para los fines aquí descritos.

Las secuencias "complementarias", como se usan en el presente documento, también pueden incluir, o estar formadas completamente a partir de, pares de bases no Watson-Crick o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en la medida en que se cumplan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad de hibridación. Dichos pares de bases que no son de Watson-Crick incluyen, entre otros, pares de bases G:U Wobble o Hoogsteen.

Los términos "complementario", "totalmente complementario" y "sustancialmente complementario" en el presente documento se pueden usar con respecto a la coincidencia de bases entre la cadena sentido y la cadena antisentido de un ARNbc, o entre dos oligonucleótidos o

polinucleótidos, tales como la cadena antisentido de un agente de ARN bicatenario y una secuencia diana, como se entenderá por el contexto de su uso.

Como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica un gen INHBE). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario de al menos una parte de un ARNm INHBE si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica un gen INHBE.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, los polinucleótidos antisentido divulgados en el presente documento son completamente complementarios a la secuencia diana INHBE. En otras realizaciones, los polinucleótidos antisentido divulgados en el presente documento son sustancialmente complementarios a la secuencia de INHBE diana y comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos un 80 % complementaria en toda su longitud con la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, o un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, tal como aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, o aproximadamente el 99 % complementarios.

En otras realizaciones, los polinucleótidos antisentido divulgados en el presente documento son sustancialmente complementarios a la secuencia de INHBE diana y comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementaria en toda su longitud con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de cadena sentido en cualquiera de cualquiera de las Tablas 2-5, o un fragmento de cualquiera de las cadenas sentido secuencias de nucleótidos en cualquiera de las Tablas 2-5, tales como aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o 100 % complementarios.

En una realización, un agente de ARNi de la divulgación incluye una cadena sentido que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido antisentido que, a su vez, es el mismo que una secuencia de INHBE diana, y en donde el polinucleótido de cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementaria en toda su longitud con la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 o 10, o un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 o 10, tales como aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o 100 % complementarios.

En algunas realizaciones, un ARNi de la invención incluye una cadena sentido que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido antisentido que, a su vez, es complementario a una secuencia de INHBE diana, y en el que el polinucleótido de cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementario en toda su

longitud con cualquiera de las secuencias de nucleótidos de cadena antisentido en cualquiera de las Tablas 2-3, o un fragmento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de cadena antisentido en cualquiera de las Tablas 2-3, tales como aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o 100 % complementarios.

En general, un "ARNi" incluye ribonucleótidos con modificaciones químicas. Dichas modificaciones pueden incluir todos los tipos de modificaciones descritas en el presente documento o conocidas en la técnica. Cualquier modificación de este tipo, tal como se utiliza en una molécula de ARNbc, está abarcada por "ARNi" a los efectos de esta descripción y reivindicaciones.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, se puede considerar que la inclusión de un desoxinucleótido, si está presente dentro de un agente de ARNi, constituye un nucleótido modificado.

Los términos "agente polinucleotídico", "agente polinucleotídico antisentido", "compuesto antisentido" y "agente", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a un agente que comprende un oligonucleótido monocatenario que contiene ARN tal como se define ese término en el presente documento, y que se dirige a moléculas de ácido nucleico que codifican INHBE (por ejemplo, ARNm que codifica INHBE como se proporciona, por ejemplo, en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9). Los agentes polinucleotídicos antisentido se unen específicamente a las moléculas de ácido nucleico diana mediante enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso) e interfieren con la función normal del ácido nucleico diana (por ejemplo, mediante un mecanismo antisentido de acción). Esta interferencia o modulación de la función de un ácido nucleico diana por los agentes polinucleotídicos de la presente invención se denomina "inhibición antisentido".

Las funciones de la molécula de ácido nucleico diana con la que se va a interferir pueden incluir funciones tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas del ARN, corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm y actividad catalítica que puede ser involucrada o facilitada por el ARN.

En algunas realizaciones, la inhibición antisentido se refiere a "inhibir la expresión" de los niveles de ácido nucleico diana o niveles de proteína diana en una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero, en presencia del agente polinucleótido antisentido complementario a un ácido nucleico diana en comparación con los niveles de ácido nucleico diana o los niveles de proteína diana en ausencia del agente polinucleótido antisentido. Por ejemplo, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención pueden inhibir la traducción de manera estequiométrica mediante el apareamiento de bases con el ARNm y la obstrucción física de la maquinaria de traducción, véase Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347- 355.

El término "anticuerpo" se utiliza aquí en su sentido más amplio e incluye ciertos tipos de moléculas de inmunoglobulina que comprenden uno o más dominios de unión a antígeno que se unen específicamente a un antígeno o epítipo. El término anticuerpo como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que comprende al menos la región determinante de la complementariedad (CDR) 1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo de dominio único (sdAb), en donde la molécula es capaz

de unirse a un antígeno. El término anticuerpo también se refiere a moléculas que comprenden al menos CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena pesada y CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera, en las que la molécula es capaz de unirse a un antígeno. El término anticuerpo también incluye fragmentos que son capaces de unirse a un antígeno, tales como Fv, Fv monocatenario (scFv), Fab, Fab' y (Fab')₂. El término anticuerpo también incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de diversas especies tales como ratón, ser humano, mono cynomolgus, llama, camello, etc. El término también incluye anticuerpos multivalentes tales como anticuerpos bivalentes o tetravalentes. Un anticuerpo multivalente incluye, por ejemplo, una única cadena polipeptídica que comprende múltiples dominios de unión a antígeno (que contienen CDR), así como dos o más cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene uno o más dominios de unión a antígeno, estando asociadas una con otra dichas dos o más cadenas polipeptídicas, *por ejemplo*, a través de una región bisagra capaz de formar enlaces disulfuro o cualquier otra interacción covalente o no covalente.

El término "región variable de cadena pesada", como se usa en el presente documento, se refiere a una región que comprende CDR1 de cadena pesada, marco (FR) 2, CDR2, FR3 y CDR3. En algunas realizaciones, una región variable de cadena pesada también comprende al menos una porción de un FR1 y/o al menos una porción de un FR4. En algunas realizaciones, una CDR1 de cadena pesada corresponde a los residuos de Kabat 26 a 35; una CDR2 de cadena pesada corresponde a los residuos de Kabat 50 a 65; y una CDR3 de cadena pesada corresponde a los residuos de Kabat 95 a 102. Véase, por ejemplo, Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 y 1991, NIH, Bethesda, Maryland); y Figura 1. En algunas realizaciones, una CDR1 de cadena pesada corresponde a los residuos de Kabat 31 a 35; una CDR2 de cadena pesada corresponde a los residuos de Kabat 50 a 65; y una CDR3 de cadena pesada corresponde a los residuos de Kabat 95 a 102. Véase *id.*

El término "región constante de cadena pesada" como se usa en el presente documento se refiere a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Las regiones constantes de cadena pesada de ejemplo no limitantes incluyen γ , δ y α . Las regiones constantes de cadena pesada de ejemplo no limitantes también incluyen ϵ y μ . Cada región constante pesada corresponde a un isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante γ es un anticuerpo IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo IgD y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante μ es un anticuerpo IgM, y un anticuerpo que comprende una región constante ϵ es un anticuerpo IgE. Ciertos isotipos se pueden subdividir en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos IgG incluyen, entre otros, anticuerpos IgG1 (que comprende una región constante $\gamma 1$), IgG2 (que comprende una región constante $\gamma 2$), IgG3 (que comprende una región constante $\gamma 3$) e IgG4 (que comprende una región constante $\gamma 4$); los anticuerpos IgA incluyen, entre otros, anticuerpos IgA1 (que comprende una región constante $\alpha 1$) e IgA2 (que comprende una región constante $\alpha 2$); y los anticuerpos IgM incluyen, entre otros, IgM1 e IgM2.

El término "cadena pesada" (abreviado HC) como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena pesada, con o sin una secuencia líder. En algunas realizaciones, una cadena pesada comprende al menos una porción de una

región constante de cadena pesada. El término "cadena pesada de longitud completa" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, con o sin una secuencia líder.

El término "región variable de cadena ligera", como se usa en el presente documento, se refiere a una región que comprende CDR1, estructura (FR)2, CDR2, FR3 y CDR3 de cadena ligera. En algunas realizaciones, una región variable de cadena ligera también comprende un FR1 y/o un FR4. En algunas realizaciones, una CDR1 de cadena ligera corresponde a los residuos de Kabat 24 a 34; una CDR2 de cadena ligera corresponde a los residuos de Kabat 50 a 56; y una CDR3 de cadena ligera corresponde a los residuos de Kabat 89 a 97. Véase, por ejemplo, Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (1987 y 1991, NIH, Bethesda, Maryland).

El término "región constante de cadena ligera" como se usa en el presente documento se refiere a una región que comprende un dominio constante de cadena ligera, CL. Las regiones constantes de cadena ligera ejemplares no limitantes incluyen λ y κ .

El término "cadena ligera" (abreviado LC) como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena ligera, con o sin una secuencia líder. En algunas realizaciones, una cadena ligera comprende al menos una parte de una región constante de cadena ligera. El término "cadena ligera de longitud completa" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera, con o sin una secuencia líder.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a INHBE está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de INHBE). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a INHBE puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, como moléculas de INHBE de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Un "anticuerpo quimérico" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de una primera especie (tal como ratón, rata, mono cynomolgus, etc.) y al menos una región constante de una segunda especie (tal como humana, mono cynomolgus, etc.). En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de ratón y al menos una región constante humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de cynomolgus y al menos una región constante humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de rata y al menos una región constante de ratón. En algunas realizaciones, todas las regiones variables de un anticuerpo quimérico son de una primera especie y todas las regiones constantes del anticuerpo quimérico son de una segunda especie.

Un "anticuerpo humanizado" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo en el que al menos un aminoácido en una región estructural de una región variable no humana se ha reemplazado con el aminoácido correspondiente de una región variable humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende al menos una región constante humana o

fragmento de la misma. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un sdAb, un Fab, un scFv, un (Fab')₂, etc. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluidos, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y se pueden seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Un "anticuerpo humano" como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos producidos en humanos, anticuerpos producidos en animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulina humana, tales como XenoMouse®, y anticuerpos seleccionados usando métodos *in vitro*, tales como presentación en fagos, en donde el repertorio de anticuerpos se basa en secuencias de inmunoglobulina humana.

Los términos "un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a INHBE", o "un anticuerpo anti-INHBE o fragmento de unión a antígeno del mismo", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a INHBE, por ejemplo, INHBE humano. Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, es decir, INHBE, es uno capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente al INHBE humano. A menos que se indique lo contrario, el término "anticuerpo anti-INHBE" pretende referirse a un anticuerpo que se une a INHBE de tipo salvaje, una variante o una isoforma de INHBE.

En una realización, la frase "se une específicamente a INHBE" o "unión específica a INHBE", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo anti-INHBE para interactuar con INHBE con una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 2000 nM o menos, aproximadamente 1.000 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 200 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 21 nM o menos, aproximadamente 12 nM o menos, aproximadamente 11 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 9 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,1 nM o menos, aproximadamente 0,01 nM o menos, o aproximadamente 0,001 nM o menos. En otra realización, la frase "se une específicamente a INHBE" o "unión específica a INHBE", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo anti-INHBE para interactuar con INHBE con una constante de disociación (K_D) de entre aproximadamente 1 pM (0,001 nM) a 2000 nM, entre aproximadamente 500 pM (0,5 nM) a 1000 nM, entre aproximadamente 500 pM (0,5 nM) a 500 nM, entre aproximadamente 1 nM) a 200 nM, entre aproximadamente 1 nM a 100 nM, entre aproximadamente 1 nM y 50 nM, entre aproximadamente 1 nM y 20 nM, o entre aproximadamente 1 nM y 5 nM. En una realización, KD_{se} determina mediante resonancia de plasmón superficial o mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

Los términos "numeración Kabat", "definiciones Kabat" y "etiquetado Kabat" se utilizan indistintamente en este documento. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno de este (Kabat *et al.* (1971) *Ann. NY Acad. Sci.* 190:382-391 y Kabat, EA, *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH No. 91-3242). Para la región variable de cadena pesada, la región hipervariable oscila entre las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable oscila entre las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se usa en el presente documento, el término "CDR" se refiere a la región determinante de la complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpos. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC), que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 (o específicamente HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, y LC CDR3), para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" como se utiliza en el presente documento se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de forma diferente según los diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no sólo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, pero también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y Chothia *et al.*, *Nature* 342:877-883 (1989)) encontró que ciertas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de esqueleto peptídico casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones fueron designadas como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde "L" y "H" designan las regiones de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Otros límites que definen Padlan (*FASEB J.* 9:133-139 (1995)) y MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996)) han descrito CDR que se superponen con las CDR de Kabat. Es posible que otras definiciones de límites de CDR no sigan estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero no obstante se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o hallazgos experimentales de que residuos o grupos de residuos particulares o incluso CDR enteras no lo hacen. no afecta significativamente la unión al antígeno. Los métodos utilizados en el presente documento pueden utilizar CDR definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque las realizaciones preferidas utilizan CDR definidas por Kabat o Chothia.

Como se usa en el presente documento, el término "estructura" o "secuencia marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Dado que la definición exacta de

una secuencia CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de cadena ligera y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de cadena pesada) también dividen las regiones estructurales de la cadena ligera y de la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 está situada entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como lo refieren otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina de origen natural. Como se usa en el presente documento, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco.

No es necesario que las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan precisamente a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso pueden mutagenizarse mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido de modo que la CDR o el residuo del marco en ese sitio no corresponde ni al anticuerpo donante ni al marco de consenso. Sin embargo, en una realización preferida, dichas mutaciones no serán extensas. Normalmente, al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % y lo más preferiblemente al menos el 95 % de los residuos de anticuerpo humanizado corresponderán a los de las secuencias de FR y CDR parentales. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "marco de consenso" se refiere a la región marco en la secuencia de inmunoglobulina de consenso. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "secuencia de inmunoglobulina consensuada" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que aparecen con más frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulina relacionadas (véase, *por ejemplo*, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que ocurre con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos ocurren con la misma frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

El término "epítipo" se refiere a una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En determinadas realizaciones, los determinantes de epítipos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas realizaciones, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. En determinadas realizaciones, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia de plasmón superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, Nueva Jersey). Para más descripciones, véase Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ana. Biol.*

Clínico. 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Reconocer* 8:125-131; y Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Bioquímica*. 198:268-277.

El término " k_{on} " o " k_a ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación de un anticuerpo con el antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno.

El término " k_{off} " o " k_d ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular. K_D se calcula mediante k_a / k_d . En una realización, los anticuerpos de la invención tienen una K_D de aproximadamente 2000 nM o menos, aproximadamente 1000 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 200 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 21 nM o menos, aproximadamente 12 nM o menos, aproximadamente 11 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 9 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 7 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,1 nM o menos, aproximadamente 0,01 nM o menos, o aproximadamente 0,001 nM o menos.

La frase "poner en contacto una célula con un modulador", tal como un agente polinucleótido antisentido, como se usa en el presente documento, incluye poner en contacto una célula por cualquier medio posible. Poner en contacto una célula con un modulador incluye poner en contacto una célula *in vitro* con el modulador o poner en contacto una célula *in vivo* con el modulador. El contacto podrá realizarse directa o indirectamente. Así, por ejemplo, el modulador puede ponerse en contacto físico con la célula por parte del individuo que realiza el método, o alternativamente, el modulador puede ponerse en una situación que permitirá o provocará que posteriormente entre en contacto con la célula.

El contacto de una célula *in vitro* se puede realizar, por ejemplo, incubando la célula con el modulador. El contacto con una célula *in vivo* se puede realizar, por ejemplo, inyectando el modulador en o cerca del tejido donde está ubicada la célula, o inyectando el modulador en otra área, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de manera que el modulador posteriormente llegue al tejido donde se encuentra la célula a contactar. Por ejemplo, el modulador, por ejemplo, ARNi, puede contener o estar acoplado a un ligando, por ejemplo, GalNAc, que dirige el ARNi a un sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También son posibles combinaciones de métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, también se puede poner en contacto una célula *in vitro* con un modulador y posteriormente trasplantarla a un sujeto.

En determinadas realizaciones, poner en contacto una célula con un modulador incluye "introducir" o "entregar el modulador en la célula" facilitando o efectuando la captación o absorción en la célula. La absorción o captación de un ARNi puede ocurrir mediante difusión sin ayuda o procesos celulares activos, o mediante agentes o dispositivos auxiliares. La introducción de un modulador en una célula puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, para la introducción *in vivo*,

se puede inyectar un modulador en un sitio de tejido o administrarse sistémicamente. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección. Se describen enfoques adicionales en el presente documento a continuación o se conocen en la técnica.

El término "nanopartícula lipídica" o "LNP" es una vesícula que comprende una capa lipídica que encapsula una molécula farmacéuticamente activa, tal como una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNi o un plásmido a partir del cual se transcribe un ARNi. Los LNP se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. Nos. 6.858.225, 6.815.432, 8.158.601 y 8.058.069, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Como se usa en el presente documento, un "sujeto" es un animal, tal como un mamífero, incluyendo un primate (tal como un humano, un primate no humano, por ejemplo, un mono y un chimpancé), un no primate (tal como una vaca, un cerdo, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de indias, un gato, un perro, una rata o un ratón), o un ave que expresa el gen diana, ya sea de forma endógena o heterológamente. En una realización, el sujeto es un ser humano, tal como un ser humano tratado o evaluado por una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión y/o actividad de INHBE; un ser humano en riesgo de sufrir una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión y/o actividad de INHBE; un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión y/o actividad de INHBE; o ser humano tratado por una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión y/o actividad de INHBE como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto es un humano femenino. En otras realizaciones, el sujeto es un ser humano masculino. En una realización, el sujeto es un sujeto adulto. En otra realización, el sujeto es un sujeto pediátrico.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un resultado beneficioso o deseado, tal como reducir al menos un signo o síntoma de un trastorno asociado a INHBE en un sujeto. El tratamiento también incluye una reducción de uno o más signos o síntomas asociados con expresión y/o actividad de INHBE no deseado; disminuir la extensión de la activación o estabilización no deseada de INHBE; mejoramiento o paliación de la activación o estabilización no deseada de INHBE. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada en ausencia de tratamiento.

El término "más bajo" en el contexto del nivel de INHBE en un sujeto o un marcador o síntoma de enfermedad se refiere a una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. En determinadas realizaciones, una disminución es de al menos el 20 %. En determinadas realizaciones, la disminución es de al menos el 50 % en un marcador de enfermedad, por ejemplo, nivel de expresión génica o proteica. "Más bajo" en el contexto del nivel de INHBE en un sujeto es una disminución a un nivel aceptado como dentro del rango normal para un individuo sin dicho trastorno. En ciertas realizaciones, "inferior" es la disminución en la diferencia entre el nivel de un marcador o síntoma para un sujeto que padece una enfermedad y un nivel aceptado dentro del rango normal para un individuo. El término "inferior" también se puede

utilizar en asociación con la normalización de un síntoma de una enfermedad o afección, es decir, disminuir la diferencia entre un nivel en un sujeto que padece un trastorno asociado a INHBE y un nivel en un sujeto normal que no padece un trastorno asociado a INHBE. Tal como se utiliza en el presente documento, si una enfermedad está asociada con un valor elevado de un síntoma, se considera "normal" el límite superior de lo normal. Si una enfermedad se asocia con una disminución del valor de un síntoma, se considera "normal" el límite inferior de lo normal.

Como se usa en el presente documento, "prevención" o "previniendo", cuando se usa en referencia a una enfermedad, trastorno o condición del mismo, puede tratarse o mejorarse mediante una reducción en la expresión y/o actividad de INHBE, se refiere a una reducción en la probabilidad de que un sujeto desarrollará un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección, por ejemplo, un síntoma de un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, trastorno metabólico, por ejemplo, diabetes. La imposibilidad de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección, o la reducción en el desarrollo de un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección (*p. ej.*, en al menos aproximadamente un 10 % en una escala clínicamente aceptada para esa enfermedad o trastorno), o la exhibición de síntomas tardíos (*p. ej.*, por días, semanas, meses o años) se considera prevención eficaz.

Como se utiliza en el presente documento, el término "trastorno asociado a la subunidad beta E de la inhibina" o "trastorno asociado a INHBE" es una enfermedad o trastorno causado por, o asociado con, la expresión del gen INHBE o la producción y/o actividad de la proteína INHBE. El término "trastorno asociado a INHBE" incluye una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de una disminución en la expresión, replicación o actividad de la proteína del gen INHBE. En algunas realizaciones, el trastorno asociado a INHBE es un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico.

Tal como se utiliza en este documento, un "trastorno metabólico" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que altere el metabolismo normal, el proceso de convertir los alimentos en energía a nivel celular. Las enfermedades metabólicas afectan la capacidad de la célula para realizar reacciones bioquímicas críticas que implican el procesamiento o transporte de proteínas (aminoácidos), carbohidratos (azúcares y almidones) o lípidos (ácidos grasos). Los ejemplos no limitantes de enfermedades metabólicas incluyen trastornos de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes, diabetes tipo I, diabetes tipo II, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, deficiencia de fructosa 1,6-difosfatasa, trastornos del almacenamiento de glucógeno, trastornos congénitos de la glicosilación, resistencia a la insulina, insuficiencia de insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa (IGT), metabolismo anormal del glucógeno; trastornos del metabolismo de los aminoácidos, por ejemplo, enfermedad de la orina con jarabe de arce (MSUD) u homocistinuria; trastorno del metabolismo de los ácidos orgánicos, por ejemplo, aciduria metilmalónica, aciduria 3-metilglutacónica -síndrome de Barth, aciduria glutárica o aciduria 2-hidroxiglutárica - formas D y L; trastornos de la beta-oxidación de ácidos grasos, por ejemplo, deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD), deficiencia de 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD), deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD); trastornos del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, gangliosidosis GM1, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad

de Sandhoff, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Krabbe, mucopolisacaridosis o mucopolisacaridosis; trastornos mitocondriales, por ejemplo, miocardiopatías mitocondriales; enfermedad de Leigh; encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios similares a accidentes cerebrovasculares (MELAS); epilepsia mioclónica con fibras rojas irregulares (MERRF); neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (NARP); síndrome de Barth; 5 trastornos peroxisomales, *por ejemplo*, síndrome de Zellweger (síndrome cerebrohepatorrenal), adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X o enfermedad de Refsum.

En una realización, un trastorno metabólico es el síndrome metabólico. El término “síndrome metabólico”, tal como se utiliza en este documento, es un trastorno que incluye un conjunto de 10 componentes que reflejan sobrenutrición, estilos de vida sedentarios, factores genéticos, edad avanzada y exceso de adiposidad resultante. El síndrome metabólico incluye el conjunto de obesidad abdominal, resistencia a la insulina, dislipidemia y presión arterial elevada y se asocia con otras comorbilidades que incluyen el estado protrombótico, el estado proinflamatorio, la enfermedad del hígado graso no alcohólico y los trastornos reproductivos. La prevalencia del síndrome metabólico ha 15 aumentado hasta alcanzar proporciones epidémicas no sólo en Estados Unidos y el resto del mundo urbanizado, sino también en los países en desarrollo. El síndrome metabólico se asocia con una duplicación aproximada del riesgo de enfermedad cardiovascular y un riesgo cinco veces mayor de diabetes mellitus tipo 2.

La adiposidad abdominal (*p. ej.*, una circunferencia de cintura grande (relación cintura-cadera alta)), la presión arterial alta, la resistencia a la insulina y la dislipidemia son fundamentales para el 20 síndrome metabólico y sus componentes individuales (*p. ej.*, obesidad central, glucosa en sangre en ayunas (FBG)/ prediabetes/diabetes, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensión).

En una realización, un trastorno metabólico es un trastorno de los carbohidratos. En una realización, el trastorno de los carbohidratos es diabetes.

25 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diabetes" se refiere a un grupo de trastornos metabólicos caracterizados por niveles elevados de azúcar (glucosa) en sangre que resultan de defectos en la secreción o acción de la insulina, o ambas. Hay dos tipos más comunes de diabetes, a saber, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, y ambas resultan de la incapacidad del cuerpo para regular la insulina. La insulina es una hormona liberada por el páncreas en respuesta al aumento de los 30 niveles de azúcar (glucosa) en la sangre.

El término "diabetes tipo I", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una enfermedad crónica que ocurre cuando el páncreas produce muy poca insulina para regular adecuadamente los niveles de azúcar en sangre. La diabetes tipo I también se conoce como diabetes mellitus insulino dependiente, IDDM y diabetes de aparición juvenil. Las personas con diabetes tipo I 35 (diabetes insulino dependiente) producen poca o ninguna insulina. Aunque alrededor del 6 por ciento de la población de Estados Unidos tiene algún tipo de diabetes, sólo alrededor del 10 por ciento de todos los diabéticos padecen el trastorno de tipo I. La mayoría de las personas que tienen diabetes tipo I desarrollaron el trastorno antes de los 30 años. La diabetes tipo 1 representa el resultado de una destrucción autoinmune progresiva de las células β pancreáticas con la posterior deficiencia de 40 insulina. Más del 90 por ciento de las células productoras de insulina (células beta) del páncreas

quedan destruidas permanentemente. La deficiencia de insulina resultante es grave y, para sobrevivir, una persona con diabetes tipo I debe inyectarse insulina con regularidad.

En la diabetes tipo II (también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente, NDDM), el páncreas continúa fabricando insulina, a veces incluso en niveles más altos de lo normal.

Sin embargo, el cuerpo desarrolla resistencia a sus efectos, lo que resulta en una relativa deficiencia de insulina. La diabetes tipo II puede ocurrir en niños y adolescentes, pero generalmente comienza después de los 30 años y se vuelve progresivamente más común con la edad: alrededor del 15 por ciento de las personas mayores de 70 años tienen diabetes tipo II. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes tipo II y entre el 80 y el 90 por ciento de las personas con este trastorno son obesas.

En algunas realizaciones, la diabetes incluye prediabetes. "Prediabetes" se refiere a una o más afecciones diabéticas tempranas que incluyen utilización alterada de la glucosa, niveles de glucosa en ayunas anormales o alterados, tolerancia a la glucosa alterada, sensibilidad a la insulina alterada y resistencia a la insulina. La prediabetes es un importante factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y mortalidad. Se ha prestado mucha atención al desarrollo de intervenciones terapéuticas que prevengan el desarrollo de diabetes tipo 2 mediante el tratamiento eficaz de la prediabetes.

La diabetes se puede diagnosticar mediante la administración de una prueba de tolerancia a la glucosa. Clínicamente, la diabetes suele dividirse en varias categorías básicas. Los ejemplos principales de estas categorías incluyen diabetes mellitus autoinmune, diabetes mellitus no insulino dependiente (DMND tipo 1), diabetes mellitus insulino dependiente (DMID tipo 2), diabetes mellitus no autoinmune, diabetes mellitus no insulino dependiente (tipo 2 NIDDM) y diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY). Una categoría adicional, a menudo denominada secundaria, se refiere a la diabetes provocada por alguna afección identificable que causa o permite que se desarrolle un síndrome diabético. Ejemplos de categorías secundarias incluyen diabetes causada por enfermedad pancreática, anomalías hormonales, diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas, diabetes causada por anomalías del receptor de insulina, diabetes asociada con síndromes genéticos y diabetes por otras causas (véase, por ejemplo, Harrison's (1996) 14ª ed., Nueva York, McGraw-Hill).

En una realización, un trastorno metabólico es un trastorno del metabolismo de los lípidos. Como se utiliza en el presente documento, un "trastorno del metabolismo de los lípidos" o "trastorno del metabolismo de los lípidos" se refiere a cualquier trastorno asociado o causado por una alteración en el metabolismo de los lípidos. Este término también incluye cualquier trastorno, enfermedad o afección que pueda provocar hiperlipidemia o afección caracterizada por una elevación anormal de los niveles de cualquiera o todos los lípidos y/o lipoproteínas en la sangre. Este término se refiere a un trastorno hereditario, tal como hipertrigliceridemia familiar, lipodistrofia parcial familiar tipo 1 (FPLD1), o un trastorno inducido o adquirido, tal como un trastorno inducido o adquirido como resultado de una enfermedad, trastorno o condición (por ejemplo, enfermedad renal). fracaso), una dieta o la ingesta de ciertos medicamentos (p. ej., como resultado de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) utilizada para tratar, p. ej., el SIDA o el VIH).

Ejemplos adicionales de trastornos del metabolismo de los lípidos incluyen, entre otros, aterosclerosis, dislipidemia, hipertrigliceridemia (incluyendo hipertrigliceridemia inducida por

fármacos, hipertrigliceridemia inducida por diuréticos, hipertrigliceridemia inducida por alcohol, hipertrigliceridemia inducida por agentes bloqueadores β -adrenérgicos, hipertrigliceridemia inducida por estrógenos), hipertrigliceridemia inducida por glucocorticoides, hipertrigliceridemia inducida por retinoides, hipertrigliceridemia inducida por cimetidina e hipertrigliceridemia familiar), pancreatitis aguda asociada con hipertrigliceridemia, síndrome de quilomicrón, quilomicronemia familiar, deficiencia o resistencia a Apo-E, deficiencia o hipoactividad de LPL, hiperlipidemia (incluida la combinación familiar hiperlipidemia), hipercolesterolemia, gota asociada a hipercolesterolemia, xantomatosis (depósitos subcutáneos de colesterol), hiperlipidemia con deficiencia heterogénea de LPL, hiperlipidemia con LDL alto y deficiencia heterogénea de LPL, enfermedad del hígado graso o estetohepatitis no alcohólica (NASH).

Las enfermedades cardiovasculares también se consideran "trastornos metabólicos", tal como se definen en el presente documento. Estas enfermedades pueden incluir enfermedad de las arterias coronarias (también llamada cardiopatía isquémica), hipertensión, inflamación asociada con la enfermedad de las arterias coronarias, reestenosis, enfermedades vasculares periféricas y accidentes cerebrovasculares.

Los trastornos relacionados con el peso corporal también se consideran "trastornos metabólicos", tal como se definen en el presente documento. Dichos trastornos pueden incluir obesidad, estados hipometabólicos, hipotiroidismo, uremia y otras afecciones asociadas con el aumento de peso (incluido el aumento rápido de peso), la pérdida de peso, el mantenimiento de la pérdida de peso o el riesgo de recuperar peso después de la pérdida de peso.

Los trastornos del azúcar en sangre se consideran además "trastornos metabólicos", tal como se definen en el presente documento. Dichos trastornos pueden incluir diabetes, hipertensión y síndrome de ovario poliquístico relacionado con la resistencia a la insulina. Otros trastornos ejemplares de trastornos metabólicos también pueden incluir trasplante renal, síndrome nefrótico, síndrome de Cushing, acromegalia, lupus eritematoso sistémico, disglobulinemia, lipodistrofia, glucogenosis tipo I y enfermedad de Addison.

En una realización, un trastorno asociado a INHBE es hipertensión primaria. La "hipertensión primaria" es el resultado de causas ambientales o genéticas (p. ej., el resultado de una causa médica subyacente no obvia).

En una realización, un trastorno asociado a INHBE es hipertensión secundaria. La "hipertensión secundaria" tiene un trastorno subyacente identificable que puede tener múltiples etiologías, incluidas causas renales, vasculares y endocrinas, por ejemplo, enfermedad parenquimatosa renal (por ejemplo, riñones poliquísticos, enfermedad glomerular o intersticial), enfermedad vascular renal (por ejemplo, enfermedad de la arteria renal). estenosis, displasia fibromuscular), trastornos endocrinos (p. ej., exceso de adrenocorticosteroides o mineralocorticoides, feocromocitoma, hipertiroidismo o hipotiroidismo, exceso de hormona del crecimiento, hiperparatiroidismo), coartación de la aorta o uso de anticonceptivos orales.

En una realización, un trastorno asociado a INHBE es hipertensión resistente. La "hipertensión resistente" es la presión arterial que se mantiene por encima del objetivo (p. ej., superior a 130 mm Hg sistólica o superior a 90 diastólica) a pesar del uso simultáneo de tres agentes

antihipertensivos de diferentes clases, uno de los cuales es un diurético tiazídico. También se considera que los sujetos cuya presión arterial está controlada con cuatro o más medicamentos tienen hipertensión resistente.

Enfermedades o afecciones adicionales relacionadas con trastornos metabólicos que serían evidentes para el experto en la técnica y están dentro del alcance de esta divulgación.

"Cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir la cantidad de un modulador que, cuando se administra a un sujeto que tiene un trastorno asociado a INHBE, es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, disminuyendo, mejorando, o mantener la enfermedad existente o uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del modulador, cómo se administra el agente, la enfermedad y su gravedad y los antecedentes, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos anteriores o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del sujeto a tratar.

"Cantidad profilácticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir la cantidad de un modulador que, cuando se administra a un sujeto que tiene un trastorno asociado a INHBE, es suficiente para prevenir o mejorar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. Mejorar la enfermedad incluye ralentizar el curso de la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad que se desarrolla posteriormente. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar dependiendo del modulador, cómo se administra el modulador, el grado de riesgo de enfermedad y los antecedentes, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos anteriores o concomitantes, si los hubiera, y otras características individuales del paciente a tratar.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad profilácticamente eficaz" también incluye una cantidad de un modulador que produce algún efecto deseado con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. El modulador empleado en los métodos de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para producir una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de sujetos humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, auxiliar de fabricación líquido o sólido (por ejemplo, lubricante, talco magnésico, estearato de calcio o zinc, o ácido estérico), o material encapsulante de disolvente, involucrado en llevar o transportar el compuesto en cuestión desde un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el sujeto que se está tratando.

Dichos vehículos son conocidos en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos para administración mediante inyección.

El término "muestra", tal como se utiliza en el presente documento, incluye una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, fluido cerebroespinal, fluidos oculares, linfa, orina, saliva y similares. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de tejidos, órganos o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivarse de órganos particulares, partes de órganos o fluidos o células dentro de esos órganos. En determinadas realizaciones, las muestras pueden derivarse del hígado (p. ej., hígado completo o ciertos segmentos de hígado o ciertos tipos de células en el hígado, tales como, p. ej., hepatocitos). En algunas realizaciones, una "muestra derivada de un sujeto" se refiere a orina obtenida del sujeto. Una "muestra derivada de un sujeto" puede referirse a sangre o suero o plasma derivado de sangre del sujeto.

II. Moduladores de la invención

La presente invención proporciona moduladores, es decir, inhibidores, de INHBE y composiciones que comprenden dichos moduladores para su uso en la modulación de la expresión y/o actividad de INHBE. En algunas realizaciones, los moduladores y composiciones de la invención son para usar en el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano susceptible de desarrollar un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, trastornos del peso corporal.

En un aspecto, la presente invención proporciona un modulador de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE).

El modulador puede ser un oligonucleótido que se dirige a INHBE, tal como un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) o un agente polinucleotídico antisentido; un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a INHBE, tal como un anticuerpo monoclonal anti-INHBE, o fragmento de unión a antígeno del mismo; una pequeña molécula; un ARN guía que efectúa la edición de ADAR, tal como un ARN guía que incluye una estructura de bucle madre que se une a la enzima ADAR; o un ARN guía que efectúa la edición CRISPR.

En una realización, el modulador de la invención es un ARNi, por ejemplo, un agente de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), dirigido a un gen INHBE.

En una realización, el modulador de la invención es un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE.

En una realización, el modulador de la invención es un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a INHBE, por ejemplo, un anticuerpo anti-INHBE humano, humanizado o quimérico, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En algunas realizaciones, el modulador de INHBE es una molécula pequeña.

En algunas realizaciones, el modulador de INHBE es un aptámero. En algunas realizaciones, el aptámero es un aptámero de oligonucleótido. En algunas realizaciones, el aptámero es un aptámero peptídico.

En algunas realizaciones, el modulador de INHBE es un ARN guía que efectúa la edición de la adenosina desaminasa (ADAR) específica de ARN bicatenario, tal como un ARN guía que incluye una estructura de bucle de tallo que se une a la enzima ADAR.

En alguna realización, el modulador de INHBE es un ARN guía que efectúa la edición CRIPR.

A. Oligonucleótidos de la invención que se dirigen a INHBE

i. ARNi de la invención

En una realización, el modulador de oligonucleótidos de la invención que se dirige a INHBE es un ARNi.

En consecuencia, la presente invención proporciona composiciones de ARNi que efectúan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de transcritos de ARN de una subunidad beta E de gen de inhibina (INHBE). El gen puede estar dentro de una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un ser humano. El uso de estos ARNi permite la degradación selectiva de los ARNm del gen correspondiente (INHBE) en mamíferos.

Los ARNi de la invención se han diseñado para apuntar al gen de la subunidad beta E de la inhibina humana (INHBE), incluidas partes del gen que se conservan en los ortólogos de INHBE de otras especies de mamíferos. Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que una combinación o subcombinación de las propiedades anteriores y los sitios diana específicos o las modificaciones específicas en estos ARNi confieren a los ARNi de la invención eficacia, estabilidad, potencia, durabilidad y seguridad mejoradas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para tratar y prevenir un trastorno asociado a la subunidad beta E de la inhibina (INHBE), por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, un trastorno cardiovascular enfermedad, un trastorno del peso corporal, utilizando composiciones de ARNi que efectúan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de transcripciones de ARN de un gen INHBE.

Los ARNi de la invención incluyen una cadena de ARN (la cadena antisentido) que tiene una región que tiene una longitud de hasta aproximadamente 30 nucleótidos o menos, por ejemplo, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26., 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 nucleótidos de longitud, cuya región es sustancialmente complementaria a al menos parte de una transcripción de ARNm de un gen INHBE.

En determinadas realizaciones, una o ambas cadenas de los agentes de ARNi bicatenario de la invención tienen una longitud de hasta 66 nucleótidos, por ejemplo, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que es

sustancialmente complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARNm de un gen INHBE. En algunas realizaciones, dichos agentes de ARNi que tienen cadenas antisentido de longitud más larga pueden, por ejemplo, incluir una segunda cadena de ARN (la cadena sentido) de 20-60 nucleótidos de longitud en la que las cadenas sentido y antisentido forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

El uso de los ARNi según la invención permite la degradación dirigida de los ARNm del gen correspondiente (gen INHBE) en mamíferos. Utilizando ensayos *in vitro*, los presentes inventores han demostrado que los ARNi dirigidos a un gen INHBE pueden mediar potentemente el ARNi, dando como resultado una inhibición significativa de la expresión de un gen INHBE. Por lo tanto, los métodos y composiciones que incluyen estos ARNi son útiles para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos y terapias combinadas para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la inhibición o reducción de la expresión de un gen INHBE, por ejemplo, una enfermedad asociada a la subunidad beta E de la inhibina (INHBE), tal como un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal, usando composiciones de ARNi que efectúan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido (RISC) de transcripciones de ARN de un gen INHBE.

La presente invención también proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de inhibir o reducir la expresión de un gen INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, tipo II diabetes, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal.

En un aspecto, la presente invención proporciona ARNi que inhiben la expresión de un gen INHBE. En determinadas realizaciones, el ARNi incluye moléculas de ácido ribonucleico de doble cadena (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen INHBE en una célula, tal como una célula dentro de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano susceptible de desarrollar un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, trastornos del peso corporal. El agente ARNbc incluye una cadena antisentido que tiene una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de un gen INHBE. La región de complementariedad tiene aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 ó 19 nucleótidos de longitud).

Al entrar en contacto con una célula que expresa el gen INHBE, el ARNi inhibe la expresión del gen INHBE (por ejemplo, un gen INHBE humano, de primate, de no primate o de rata) en al menos aproximadamente un 50 % según lo analizado por, por ejemplo, un método basado en PCR o ADN ramificado (ADNb), o mediante un método basado en proteínas, tal como mediante análisis de inmunofluorescencia, usando, por ejemplo, técnicas de transferencia Western o citometría de flujo. En determinadas realizaciones, la inhibición de la expresión se determina mediante el método qPCR proporcionado en los ejemplos del presente documento con el ARNip, por ejemplo, a una concentración de 10 nM, en una línea celular de organismo apropiada proporcionada en el mismo. En determinadas realizaciones, la inhibición de la expresión *in vivo* se determina mediante la desactivación del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, por ejemplo, un ratón o un ratón infectado con AAV que expresa el gen diana humano, por ejemplo, cuando se administra como dosis única, por ejemplo, a 3 mg/kg en el punto más bajo de la expresión de ARN.

Un ARNbc incluye dos cadenas de ARN que son complementarias y se hibridan para formar una estructura dúplex en las condiciones en las que se utilizará el ARNbc. Una cadena de un ARNbc (la cadena antisentido) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria y generalmente completamente complementaria, a una secuencia diana. La secuencia diana puede derivarse de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de un gen INHBE. La otra cadena (la cadena sentido) incluye una región que es complementaria a la cadena antisentido, de modo que las dos cadenas se hibridan y forman una estructura dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. Como se describe en otra parte del presente documento y como se conoce en la técnica, las secuencias complementarias de un ARNbc también pueden estar contenidas como regiones autocomplementarias de una única molécula de ácido nucleico, en lugar de estar en oligonucleótidos separados.

Generalmente, la estructura dúplex tiene una longitud de 15 a 30 pares de bases, por ejemplo, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 pares de bases de longitud. En ciertas realizaciones, la estructura dúplex tiene una longitud de 18 a 25 pares de bases, por ejemplo, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 o 24-25 pares de bases de longitud, por ejemplo, 19-21 pares de bases de longitud. También se contempla que formen parte de la divulgación rangos y longitudes intermedias a los rangos y longitudes mencionados anteriormente.

De manera similar, la región de complementariedad con la secuencia diana tiene una longitud de 15 a 30 nucleótidos, por ejemplo, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 nucleótidos de longitud, por ejemplo 19-23 nucleótidos de longitud o 21-23 nucleótidos

de longitud. También se contempla que formen parte de la divulgación rangos y longitudes intermedias a los rangos y longitudes citados anteriormente.

En algunas realizaciones, la estructura dúplex tiene una longitud de 19 a 30 pares de bases. De manera similar, la región de complementariedad con la secuencia diana tiene una longitud de 19 a 30 nucleótidos.

En algunas realizaciones, el ARNbc tiene una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En general, el ARNbc es lo suficientemente largo como para servir como sustrato para la enzima Dicer. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que los ARNbc de más de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud pueden servir como sustratos para Dicer. Como también reconocerá el experto habitual, la región de un ARN diana de la escisión será con mayor frecuencia parte de una molécula de ARN más grande, a menudo una molécula de ARNm. Cuando sea relevante, una "parte" de una diana de ARNm es una secuencia contigua de una diana de ARNm de longitud suficiente para permitirle ser un sustrato para la escisión dirigida por ARNi (es decir, escisión a través de una vía RISC).

Un experto en la técnica también reconocerá que la región dúplex es una porción funcional primaria de un ARNbc, por ejemplo, una región dúplex de aproximadamente 19 a aproximadamente 30 pares de bases, por ejemplo, aproximadamente 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 o 21-22 pares de bases. Por lo tanto, en una realización, en la medida en que se procese a un dúplex funcional, de, por ejemplo, 15-30 pares de bases, que se dirige a un ARN deseado para la escisión, una molécula de ARN o complejo de moléculas de ARN que tenga una región dúplex mayor que 30 pares de bases es un ARNbc. Por lo tanto, un experto habitual en la técnica reconocerá que en una realización, un miARN es un ARNbc. En otra realización, un ARNbc no es un miARN de origen natural. En otra realización, un agente de ARNi útil para dirigirse a la expresión del gen INHBE no se genera en la célula diana mediante la escisión de un ARNbc más grande.

Un ARNbc como se describe en el presente documento puede incluir además uno o más salientes de nucleótidos monocatenarios, por ejemplo, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Los ARNbc que tienen al menos un nucleótido saliente pueden tener propiedades inhibitoras superiores en relación con sus homólogos de extremos romos. Un saliente de nucleótido puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluido un desoxinucleótido/nucleósido. Los salientes pueden estar en la cadena sentido, en la cadena antisentido o en cualquier combinación de las mismas. Además, el o los nucleótidos de un saliente pueden estar presentes en el extremo 5', en el extremo 3' o en ambos extremos de una cadena sentido o antisentido de un ARNbc.

Se puede sintetizar un ARNbc mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Los compuestos de ARNi bicatenario de la invención se pueden preparar usando un procedimiento de dos pasos. En primer lugar, se preparan por separado las cadenas individuales de la molécula de ARN bicatenario. Luego, las cadenas componentes se hibridan. Las cadenas individuales del compuesto de ARNip se pueden preparar mediante síntesis orgánica en fase de solución o en fase sólida, o ambas.

La síntesis orgánica ofrece la ventaja de que las cadenas de oligonucleótidos que comprenden nucleótidos no naturales o modificados se pueden preparar fácilmente. De manera similar, los oligonucleótidos monocatenarios de la invención se pueden preparar usando síntesis orgánica en fase de solución o en fase sólida, o ambas.

En un aspecto, un ARNbc de la invención incluye al menos dos secuencias de nucleótidos, una secuencia sentido y una secuencia antisentido. La cadena sentido se selecciona del grupo de secuencias proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2-3, y la cadena antisentido correspondiente de la cadena sentido se selecciona del grupo de secuencias de una cualquiera de las Tablas 2-3. En este aspecto, una de las dos secuencias es complementaria a la otra de las dos secuencias, siendo una de las secuencias sustancialmente complementaria a una secuencia de un ARNm generado en la expresión de un Gen INHBE. Como tal, en este aspecto, un ARNbc incluirá dos oligonucleótidos, donde un oligonucleótido se describe como la cadena sentido en cualquiera de las Tablas 2-3, y el segundo oligonucleótido se describe como la cadena antisentido correspondiente de la cadena sentido en cualquiera de las Tablas 2-3.

En determinadas realizaciones, las secuencias sustancialmente complementarias del ARNbc están contenidas en oligonucleótidos separados. En otras realizaciones, las secuencias sustancialmente complementarias del ARNbc están contenidas en un único oligonucleótido.

Se entenderá que, aunque las secuencias en, por ejemplo, la Tabla 3, no se describen como secuencias modificadas o conjugadas, el ARN del ARNi de la invención, por ejemplo, un ARNbc de la invención, puede comprender cualquiera de las secuencias establecidas. indicado en cualquiera de las Tablas 2-3 que no esté modificado, no conjugado o modificado o conjugado de manera diferente a lo descrito allí. En otras palabras, la invención abarca los ARNbc de las Tablas 2-3 que no están modificados, no conjugados, modificados o conjugados, como se describe en el presente documento.

El experto es consciente de que los ARNbc que tienen una estructura dúplex de aproximadamente 20 a 23 pares de bases, por ejemplo, 21 pares de bases, han sido aclamados como particularmente eficaces para inducir la interferencia del ARN (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han descubierto que las estructuras dúplex de ARN más cortas o más largas también pueden ser efectivas (Chu y Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). En las realizaciones descritas anteriormente, en virtud de la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2-3, los ARNbc descritos en el presente documento pueden incluir al menos una cadena de una longitud mínima de 21 nucleótidos. Puede esperarse razonablemente que los dúplex más cortos que tienen cualquiera de las secuencias de cualquiera de las Tablas 2-3 menos sólo unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos puedan ser igualmente eficaces en comparación con los ARNbc descritos anteriormente. Por lo tanto, los ARNbc que tienen una secuencia de al menos 19, 20 o más nucleótidos contiguos derivados de cualquiera de las secuencias de cualquiera de las Tablas 2-3, y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de un gen INHBE por no más de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 % de inhibición de un ARNbc que comprende la secuencia completa, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Además, los ARN proporcionados en las Tablas 2-3 identifican uno o varios sitios en un transcrito INHBE que es susceptible a la escisión mediada por RISC. Como tal, la presente invención presenta además ARNs que se dirigen dentro de uno de estos sitios. Como se usa en el presente documento, se dice que un ARNi se dirige a un sitio particular de un transcrito de ARN si el ARNi promueve la escisión del transcrito en cualquier lugar dentro de ese sitio particular. Dicho ARNi incluirá generalmente al menos aproximadamente 19 nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2-3 acopladas a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en un gen INHBE.

ii. Agentes polinucleotídicos antisentido de la invención

En una realización, el modulador de la invención es un agente polinucleótido antisentido.

Por consiguiente, la presente invención proporciona agentes polinucleotídicos, por ejemplo, agentes polinucleótidos antisentido, y composiciones que comprenden dichos agentes, que se dirigen a un gen INHBE e inhiben la expresión del gen INHBE. En una realización, los agentes polinucleotídicos, por ejemplo, agentes polinucleótidos antisentido, inhiben la expresión de un gen INHBE en una célula, tal como una célula dentro de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano que tiene una enfermedad asociada a INHBE, por ejemplo, acromegalia, gigantismo o cáncer.

Los agentes polinucleotídicos de la invención, por ejemplo, agentes polinucleótidos antisentido, incluyen una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de un gen INHBE. La región de complementariedad puede tener una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos o menos (por ejemplo, 22-12, 20-14, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos o menos de longitud). Tras el contacto con una célula que expresa el gen INHBE, el agente polinucleotídico antisentido inhibe la expresión del gen INHBE (por ejemplo, un gen INHBE humano, de primate, de no primate o de ave) en al menos un 20 % según lo analizado por, por ejemplo, un método basado en PCR o ADN ramificado (ADNb), o mediante un método basado en proteínas, tal como mediante análisis de inmunofluorescencia, usando, por ejemplo, transferencia Western o técnicas de citometría de flujo. En realizaciones preferidas, la inhibición de la expresión se determina a una concentración de 10 nM utilizando el método de administración de la línea celular.

La región de complementariedad entre un agente polinucleotídico antisentido y una secuencia diana puede ser sustancialmente complementaria (por ejemplo, existe un grado suficiente de complementariedad entre el agente polinucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para que se hibriden específicamente e induzcan un efecto deseado), pero generalmente es completamente complementario a la secuencia diana. La secuencia diana puede derivarse de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de un gen INHBE.

Por consiguiente, en un aspecto, un agente polinucleotídico antisentido de la invención se hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico diana, tal como el ARNm que codifica INHBE, y comprende una secuencia de nucleótidos contigua que corresponde al complemento inverso

de una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, o un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9.

En algunas realizaciones, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención pueden ser sustancialmente complementarios a la secuencia diana. Por ejemplo, un agente polinucleotídico antisentido que es sustancialmente complementario a la secuencia diana puede incluir una secuencia de nucleótidos contigua que comprende no más de 5 desapareamientos (por ejemplo, no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4, o no más de 5 desapareamientos) cuando se hibrida con una secuencia diana, tal como con la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica un ARNm de INHBE de mamífero. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos contigua comprende no más de un único desemparejamiento cuando se hibrida con la secuencia diana, tal como la región correspondiente de un ácido nucleico que codifica un ARNm de INHBE de mamífero.

En algunas realizaciones, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención que son sustancialmente complementarios a la secuencia diana comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos un 80 % complementaria en toda su longitud con la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, o un fragmento de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, tal como al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario.

En algunas realizaciones, un agente polinucleotídico antisentido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es completamente complementaria en toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9 (o un fragmento de cualquiera de SEQ ID NO: 1-5). Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de un agente polinucleotídico antisentido es completamente complementaria en toda su longitud con la región equivalente de nucleótidos 1-20 del número de acceso de GenBank NM_031479.5 (SEQ ID NO:1) (ver, por ejemplo, la Tabla 4 o 5).

Un agente polinucleotídico antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos contigua de aproximadamente 4 a 50 nucleótidos de longitud, o cualquier subintervalo que caiga dentro de ese rango, por ejemplo, aproximadamente 8-49, 8-48, 8-47, 8-46, 8-45, 8-44, 8-43, 8-42, 8-41, 8-40, 8-39, 8-38, 8-37, 8-36, 8-35, 8-34, 8-33, 8-32, 8-31, 8-30, 8-29, 8-28, 8-27, 8-26, 8-25, 8-24, 8-23, 8-22, 8-21, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 10-49, 10-48, 10-47, 10-46, 10-45, 10-44, 10-43, 10-42, 10-41, 10-40, 10-39, 10-38, 10-37, 10-36, 10-35, 10-34, 10-33, 10-32, 10-31, 10-30, 10-29, 10-28, 10-27, 10-26, 10-25, 10-24, 10-23, 10-22, 10-21, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-49, 11-48, 11-47, 11-46, 11-45, 11-44, 11-43, 11-42, 11-41, 11-40, 11-39, 11-38, 11-37, 11-36, 11-35, 11-34, 11-33, 11-32, 11-31, 11-30, 11-29, 11-28, 11-27, 11-26, 11-25, 11-24, 11-23, 11-22, 11-21, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-49, 12-48, 12-47, 12-46, 12-45, 12-44, 12-43, 12-42, 12-41, 12-40, 12-39, 12-38, 12-37, 12-36, 12-35, 12-34, 12-33, 12-32, 12-31, 12-30, 12-29, 12-28, 12-27, 12-26, 12-25, 12-24, 12-23, 12-22, 12-21, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-49, 13-48, 13-47, 13-46, 13-45, 13-44, 13-43, 13-42, 13-41, 13-40, 13-39, 13-38, 13-37, 13-36, 13-35, 13-34, 13-33, 13-32, 13-31, 13-30, 13-29, 13-28, 13-27, 13-26, 13-25, 13-24, 13-23, 13-22, 13-21, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-49, 14-48, 14-47, 14-46, 14-45, 14-44, 14-43, 14-42, 14-

41, 14-40, 14-39, 14-38, 14-37, 14-36, 14-35, 14-34, 14-33, 14-32, 14-31, 14-30, 14-29, 14-28, 14-27, 14-26, 14-25, 14-24, 14-23, 14-22, 14-21, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-49, 15-48, 15-47, 15-46, 15-45, 15-44, 15-43, 15-42, 15-41, 15-40, 15-39, 15-38, 15-37, 15-36, 15-35, 15-34, 15-33, 15-32, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-49, 16-48, 16-47, 16-46, 16-45, 16-44, 16-43, 16-42, 16-41, 16-40, 16-39, 16-38, 16-37, 16-36, 16-35, 16-34, 16-33, 16-32, 16-31, 16-30, 16-29, 16-28, 16-27, 16-26, 16-25, 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-49, 17-48, 17-47, 17-46, 17-45, 17-44, 17-43, 17-42, 17-41, 17-40, 17-39, 17-38, 17-37, 17-36, 17-35, 17-34, 17-33, 17-32, 17-31, 17-30, 17-29, 17-28, 17-27, 17-26, 17-25, 17-24, 17-23, 17-22, 17-21, 17-20, 17-19, 17-18, 18-49, 18-48, 18-47, 18-46, 18-45, 18-44, 18-43, 18-42, 18-41, 18-40, 18-39, 18-38, 18-37, 18-36, 18-35, 18-34, 18-33, 18-32, 18-31, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-49, 19-48, 19-47, 19-46, 19-45, 19-44, 19-43, 19-42, 19-41, 19-40, 19-39, 19-38, 19-37, 19-36, 19-35, 19-34, 19-33, 19-32, 19-31, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-49, 20-48, 20-47, 20-46, 20-45, 20-44, 20-43, 20-42, 20-41, 20-40, 20-39, 20-38, 20-37, 20-36, 20-35, 20-34, 20-33, 20-32, 20-31, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-49, 21-48, 21-47, 21-46, 21-45, 21-44, 21-43, 21-42, 21-41, 21-40, 21-39, 21-38, 21-37, 21-36, 21-35, 21-34, 21-33, 21-32, 21-31, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-49, 22-48, 22-47, 22-46, 22-45, 22-44, 22-43, 22-42, 22-41, 22-40, 22-39, 22-38, 22-37, 22-36, 22-35, 22-34, 22-33, 22-32, 22-31, 22-30, 22-29, 22-28, 22-27, 22-26, 22-25, 22-24, 22-23, 23-49, 23-48, 23-47, 23-46, 23-45, 23-44, 23-43, 23-42, 23-41, 23-40, 23-39, 23-38, 23-37, 23-36, 23-35, 23-34, 23-33, 23-32, 23-31, 23-30, 23-29, 23-28, 23-27, 23-26, 23-25, 23-24, 24-49, 24-48, 24-47, 24-46, 24-45, 24-44, 24-43, 24-42, 24-41, 24-40, 24-39, 24-38, 24-37, 24-36, 24-35, 24-34, 24-33, 24-32, 24-31, 24-30, 24-29, 24-28, 24-27, 24-26, 24-25, 25-49, 25-48, 25-47, 25-46, 25-45, 25-44, 25-43, 25-42, 25-41, 25-40, 25-39, 25-38, 25-37, 25-36, 25-35, 25-34, 25-33, 25-32, 25-31, 25-30, 25-29, 25-28, 25-27, 25-26, 26-49, 26-48, 26-47, 26-46, 26-45, 26-44, 26-43, 26-42, 26-41, 26-40, 26-39, 26-38, 26-37, 26-36, 26-35, 26-34, 26-33, 26-32, 26-31, 26-30, 26-29, 26-28, 26-27, 27-49, 27-48, 27-47, 27-46, 27-45, 27-44, 27-43, 27-42, 27-41, 27-40, 27-39, 27-38, 27-37, 27-36, 27-35, 27-34, 27-33, 27-32, 27-31, 27-30, 27-29, 27-28, 28-49, 28-48, 28-47, 28-46, 28-45, 28-44, 28-43, 28-42, 28-41, 28-40, 28-39, 28-38, 28-37, 28-36, 28-35, 28-34, 28-33, 28-32, 28-31, 28-30, 28-29, 29-49, 29-48, 29-47, 29-46, 29-45, 29-44, 29-43, 29-42, 29-41, 29-40, 29-39, 29-38, 29-37, 29-36, 29-35, 29-34, 29-33, 29-32, 29-31, 29-30, 30-49, 30-48, 30-47, 30-46, 30-45, 30-44, 30-43, 30-42, 30-41, 30-40, 30-39, 30-38, 30-37, 30-36, 30-35, 30-34, 30-33, 30-32 o 30-31 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, un agente polinucleotídico antisentido puede comprender una secuencia de nucleótidos contigua de no más de 22 nucleótidos, por ejemplo, no más de cualquiera de 21 nucleótidos, 20 nucleótidos, 19 nucleótidos, no más de 18 nucleótidos, 17 nucleótidos, 16 nucleótidos, que 15 nucleótidos o 14 nucleótidos. En otras realizaciones, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención tienen una longitud de 20 nucleótidos. En otras realizaciones, los agentes

polinucleotídicos antisentido de la invención tienen una longitud de 14 nucleótidos. En determinadas realizaciones, el polinucleótido tiene al menos 12 nucleótidos de longitud.

En un aspecto, un agente polinucleotídico antisentido de la invención incluye una secuencia seleccionada de secuencias proporcionadas en la Tabla 4 o la Tabla 5. Se entenderá que, aunque las secuencias en la Tabla 5 se describen como secuencias modificadas o conjugadas, un agente polinucleótido antisentido de la invención, también puede comprender cualquiera de las secuencias establecidas en la Tabla 5 que no esté modificada, no conjugada o modificada o conjugada de manera diferente a la descrita en la misma.

En virtud de la naturaleza de las secuencias de nucleótidos proporcionadas en las Tablas 4 o 5, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención pueden incluir una de las secuencias de las Tablas 3 o 5 menos sólo unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos y aun así seguir siendo igualmente eficaces en comparación a los agentes polinucleotídicos antisentido descritos anteriormente. Por tanto, los agentes polinucleotídicos antisentido que tienen una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos derivados de uno de las secuencias de la Tabla 4 o 5 y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de un gen INHBE por no más del 5, 10, 15, 20, 25 o 30% de inhibición de un agente polinucleotídico antisentido que comprende la secuencia completa, se considera que está dentro del alcance de la presente invención.

Además, los agentes polinucleotídicos antisentido proporcionados en las Tablas 4 y 5 identifican una región o regiones en un transcrito INHBE que es susceptible a la inhibición antisentido (por ejemplo, las regiones abarcadas por las posiciones inicial y final con respecto a las secuencias de nucleótidos en la Tabla 4). Como tal, la presente invención presenta además agentes polinucleotídicos antisentido que se dirigen dentro de uno de estos sitios.

Como se usa en el presente documento, se dice que un agente polinucleótido antisentido se dirige a un sitio particular de un transcrito de ARN si el agente polinucleótido antisentido promueve la inhibición antisentido de la diana en ese sitio. Dicho agente polinucleotídico antisentido incluirá generalmente al menos 14 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 4 o 5 acopladas a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en un gen INHBE.

Si bien una secuencia diana tiene generalmente entre 4 y 50 nucleótidos de longitud, existe una amplia variación en la idoneidad de secuencias particulares en este rango para dirigir la inhibición antisentido de cualquier ARN diana determinado. Varios paquetes de software y las directrices establecidas en este documento proporcionan orientación para la identificación de secuencias diana óptimas para cualquier gen diana determinado, pero también se puede adoptar un enfoque empírico en el que se abre una "ventana" o "máscara" de un tamaño determinado (como un ejemplo no limitante, 20 nucleótidos) se coloca literal o figurativamente (incluyendo, por ejemplo, in silico) en la secuencia de ARN diana para identificar secuencias en el rango de tamaño que pueden servir como secuencias diana. Moviendo la "ventana" de secuencia progresivamente un nucleótido hacia arriba o hacia abajo de una ubicación de secuencia diana inicial, se puede identificar la siguiente secuencia diana potencial, hasta que se identifique el conjunto completo de secuencias posibles para cualquier tamaño

diana determinado seleccionado. Este proceso, junto con la síntesis sistemática y las pruebas de las secuencias identificadas (usando ensayos como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica) para identificar aquellas secuencias que funcionan de manera óptima, pueden identificar aquellas secuencias de ARN que, cuando se dirigen a un agente polinucleotídico antisentido, median la mejor inhibición de la expresión del gen diana. Por lo tanto, aunque las secuencias identificadas, por ejemplo, en las Tablas 4 o 5 representan secuencias diana efectivas, se contempla que se puede lograr una mayor optimización de la eficacia de la inhibición antisentido "recorriendo la ventana" progresivamente un nucleótido hacia arriba o hacia abajo de las secuencias dadas para identificar secuencias con iguales o mejores características de inhibición.

Además, se contempla que para cualquier secuencia identificada, por ejemplo, en la Tabla 4 o 5, se podría lograr una optimización adicional añadiendo o eliminando sistemáticamente nucleótidos para generar secuencias más largas o más cortas y probando aquellas secuencias generadas recorriendo una ventana del tamaño más largo o más corto hacia arriba o hacia abajo del ARN diana desde ese punto. Nuevamente, acoplar este enfoque para generar nuevas dianas candidatas con pruebas de efectividad de agentes polinucleotídicos antisentido basados en esas secuencias diana en un ensayo de inhibición como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento puede conducir a mejoras adicionales en la eficiencia de la inhibición. Además, dichas secuencias optimizadas se pueden ajustar, por ejemplo, mediante la introducción de nucleótidos modificados como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica, adición o cambios en la longitud, u otras modificaciones como se conoce en la técnica o se analiza en la presente para optimizar aún más la molécula (por ejemplo, aumentar la estabilidad sérica o la vida media circulante, aumentar la estabilidad térmica, mejorar la administración transmembrana, dirigirse a una ubicación o tipo de célula particular, aumentar la interacción con las enzimas de la vía silenciadora, aumentar la liberación de los endosomas) como inhibidor de la expresión.

iii. Oligonucleótidos modificados de la invención

En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, no están modificados. y no comprenden, por ejemplo, modificaciones químicas o conjugaciones conocidas en la técnica y descritas en el presente documento. En otras realizaciones, los oligonucleótidos de la invención, por ejemplo, un ARNbc o un agente polinucleótido antisentido, se modifican químicamente para mejorar la estabilidad u otras características beneficiosas. En determinadas realizaciones de la invención, se modifican sustancialmente todos los nucleótidos de un oligonucleótido, por ejemplo, agente de ARNbc o agente polinucleótido antisentido de la invención. En otras realizaciones de la invención, todos los nucleótidos de un oligonucleótido, por ejemplo, agente de ARNbc o agente de polinucleótido antisentido, o sustancialmente todos los nucleótidos de un oligonucleótido, por ejemplo, agente de ARNbc o agente de polinucleótido antisentido, están modificados, es decir, no más más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados están presentes en una cadena del oligonucleótido, por ejemplo, agente de ARNbc o agente de polinucleótido antisentido.

Los ácidos nucleicos presentados en la invención se pueden sintetizar o modificar mediante métodos bien establecidos en la técnica, como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, SL *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE. UU., que se incorpora al presente documento como referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de los extremos, por ejemplo, modificaciones del extremo 5' (fosforilación, conjugación, enlaces invertidos) o modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, enlaces invertidos, etc.); modificaciones de bases, por ejemplo, sustitución con bases estabilizantes, bases desestabilizadoras o bases que se emparejan con un repertorio ampliado de parejas, eliminación de bases (nucleótidos abásicos) o bases conjugadas; modificaciones del azúcar (por ejemplo, en la posición 2' o en la posición 4') o sustitución del azúcar; o modificaciones de la estructura principal, incluida la modificación o sustitución de los enlaces fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos oligonucleotídicos útiles en las realizaciones descritas en el presente documento incluyen, entre otros, oligonucleótidos, por ejemplo, ARN, que contienen cadenas principales modificadas o que no contienen enlaces internucleosídicos naturales. Los oligonucleótidos, por ejemplo, ARN que tienen cadenas principales modificadas incluyen, entre otros, aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta especificación, y como a veces se hace referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados, por ejemplo, ARN, que no tienen un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos. En algunas realizaciones, un oligonucleótido modificado tendrá un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica.

Las estructuras modificadas de oligonucleótidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquilfosfonatos, incluidos 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos, fosfinatos, fosforamidatos quirales, incluidos 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de estos con enlaces 2'-5' y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácidos libres. En algunas realizaciones de la invención, los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, de la invención están en forma de ácido libre. En otras realizaciones de la invención, los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, están en forma de sal. En una realización, los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, de la invención están en forma de sal de sodio. En ciertas realizaciones, cuando los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, de la invención están en forma de sal de sodio, los iones de sodio están presentes en el agente como contraiones para sustancialmente todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotioato presentes en el agente. Los oligonucleótidos en los que sustancialmente todos los enlaces fosfodiéster y/o fosforotioato tienen un contraión de sodio incluyen no más de 5, 4, 3, 2 o 1 enlaces fosfodiéster y/o fosforotioato sin un contraión de sodio. En algunas realizaciones, cuando los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, de la invención están en forma

de sal de sodio, los iones de sodio están presentes en el oligonucleótido como contraiones para todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato presentes en el agente.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses números 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6.239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; y la patente estadounidense RE39464, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Oligonucleótidos modificados, por ejemplo, ARN, que no incluyen un átomo de fósforo en ellas, tienen cadenas principales que están formadas por enlaces internucleosídicos alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de metilenformacetilo y tioformacetilo; estructuras principales que contienen alquenos; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otros que tienen partes componentes mezcladas de N, O, S y CH₂.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses números 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Se contemplan miméticos de ARN adecuados para su uso en oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARN_{bc} o agentes polinucleotídicos antisentido, proporcionados en el presente documento, en los que tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, la estructura principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con nuevos grupos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Uno de dichos compuestos oligoméricos en el que un mimético de ARN que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación se denomina ácido peptídico nucleico (PNA). En los compuestos de PNA, la estructura principal de azúcar de un ARN se reemplaza con una estructura principal que contiene amida, en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la estructura principal. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses números 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia. Compuestos de PNA adicionales adecuados para su uso

en los oligonucleótidos, por ejemplo, ARNi de la invención, se describen, por ejemplo, en Nielsen *et al.*, *Ciencia*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas realizaciones presentadas en la invención incluyen oligonucleótidos con estructuras principales de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH--CH₂-, -CH₂-N(CH₃)--O--CH₂--[conocido como estructura principal de metileno (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)-CH₂- y -N(CH₃)-CH₂-CH₂- de la patente de EE.UU. N° 5.489.677 antes mencionada, y las estructuras principales de amida de la patente de EE.UU. Patente N° 5.602.240. En algunas realizaciones, los ARN presentados en el presente documento tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. n° 5.034.506 antes mencionada. La cadena principal de fosfodiéster nativo se puede representar como OP(O)(OH)-OCH₂-.

Oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, presentados en el presente documento pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ sustituido o no sustituido o alqueno y alquino C₂ a C₁₀. Modificaciones adecuadas ejemplares incluyen O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otras realizaciones, los ARNbc incluyen uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas realizaciones, la modificación incluye un 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ejemplar es 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos siguientes en el presente documento, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietil o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂. Otras modificaciones ejemplares incluyen: nucleótidos 5'-Me-2'-F, nucleótidos 5'-Me-2'-OMe, nucleótidos 5'-Me-2'-desoxinucleótidos (isómeros R y S en estas tres familias); 2'-alcoxialquilo; y 2'-NMA (N-metilacetamida).

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxy (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) and 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en el ARN de un ARNi, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los ARNbc unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar

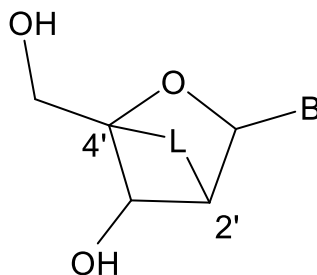
pentofuranosilo. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses números 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920, algunas de las cuales son de propiedad común con la presente solicitud. El contenido completo de cada uno de los anteriores se incorpora aquí como referencia.

Un oligonucleótido, por ejemplo, un agente de ARNbc o un agente de polinucleótido antisentido, también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales como desoxitimidina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-daazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras nucleobases incluyen las descritas en las patentes de EE.UU. 3.687.808, los descritos en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; los divulgados en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, estos divulgados por Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y los divulgados por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, ARNbc Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, ST y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos presentados en la invención. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, incluidas 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico entre 0,6 y 1,2 °C (Sanghvi, YS, Crooke, ST y Lebleu, B., Eds., ARNbc Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y son sustituciones de bases ejemplares, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses mencionadas anteriormente números 3.687.808, 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; y 7,495,088, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido, por ejemplo, un agente de ARN_{bc} o un agente de polinucleótido antisentido, de la divulgación también puede modificarse para incluir uno o más restos de azúcar bicíclico. Un “azúcar bicíclico” es un anillo de furanosilo modificado por un anillo formado por la unión de dos carbonos, ya sean adyacentes o no adyacentes. Un “nucleósido bicíclico” (“BNA”) es un nucleósido que tiene un resto de azúcar que comprende un anillo formado uniendo dos carbonos, ya sean adyacentes o no adyacentes, del anillo de azúcar, formando así un sistema de anillos bicíclico. En determinadas realizaciones, el puente conecta el carbono 4' y el carbono 2' del anillo de azúcar, opcionalmente, a través del átomo de oxígeno 2'-acíclico. Por tanto, en algunas realizaciones un agente de la invención puede incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene un resto ribosa modificado en el que el resto ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH₂-O-2'. Esta estructura “bloquea” efectivamente la ribosa en la conformación estructural endo 3'. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos bloqueados a los ARN_{ip} aumenta la estabilidad de los ARN_{ip} en el suero y reduce los efectos no deseados (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook O. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Ejemplos de nucleósidos bicíclicos para uso en los polinucleótidos de la invención incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En determinadas realizaciones, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' a 2'.

Un nucleósido bloqueado puede representarse mediante la estructura (omitiendo la estereoquímica),



en donde B es una nucleobase o una nucleobase modificada y L es el grupo enlace que une el carbono 2' al carbono 4' del anillo de ribosa. Ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos con puentes 4' a 2' incluyen, entre otros, 4'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)—O-2' (también denominado “etilo restringido” o “cEt”) y 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (y análogos de los mismos; ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 7.399.845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 8.278.283); 4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 8.278.425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. n° 2004/0171570); 4'-CH₂—N(R)—O-2', en el que R es H, alquilo C1-C12 o un grupo protector de nitrógeno (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. n° 7.427.672); 4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (véase, por ejemplo, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (y análogos de los mismos; véase, por

ejemplo, la patente de EE.UU. n° 8.278.426). El contenido completo de cada uno de los anteriores se incorpora aquí como referencia.

Patentes estadounidenses representativas adicionales y publicaciones de patentes estadounidenses que enseñan la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueados incluyen, entre otras, las siguientes: Patentes estadounidenses números 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.034.133; 7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; EE.UU. 2008/0039618; y US 2009/0012281, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Cualquiera de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse teniendo una o más configuraciones de azúcar estereoquímicas que incluyen, por ejemplo, α -L-ribofuranosa y β -D-ribofuranosa (véase el documento WO 99/14226).

Un nucleótido de un oligonucleótido, por ejemplo, un agente de ARNbc o un agente de polinucleótido antisentido, también puede modificarse para incluir uno o más etilnucleótidos restringidos. Como se usa en el presente documento, un "etilnucleótido restringido" o "cEt" es un ácido nucleico bloqueado que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente a 4'-CH(CH₃)-O-2' (es decir, L en la estructura anterior). En una realización, un nucleótido de etilo restringido está en la conformación S denominada en el presente documento "S-cEt".

Un oligonucleótido, por ejemplo, un agente de ARNbc o un agente de polinucleótido antisentido, de la invención también puede incluir uno o más "nucleótidos conformacionalmente restringidos" ("CRN"). Los CRN son análogos de nucleótidos con un enlace que conecta los carbonos C2' y C4' de la ribosa o los carbonos C3 y -C5' de la ribosa. CRN bloquea el anillo de ribosa en una conformación estable y aumenta la afinidad de hibridación con el ARNm. El enlace tiene una longitud suficiente para colocar el oxígeno en una posición óptima para lograr estabilidad y afinidad, lo que da como resultado un menor fruncimiento del anillo de ribosa.

Las publicaciones representativas que enseñan la preparación de algunos de los CRN mencionados anteriormente incluyen, entre otras, la publicación de patente de EE. UU. N° 2013/0190383; y la publicación PCT WO 2013/036868, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido, por ejemplo, agente de ARNbc o agente de polinucleótido antisentido, de la invención comprende uno o más monómeros que son nucleótidos UNA (ácido nucleico desbloqueado). UNA es un ácido nucleico acíclico desbloqueado, en el que cualquiera de los enlaces del azúcar se ha eliminado, formando un residuo de "azúcar" desbloqueado. En un ejemplo, UNA también abarca monómero con enlaces entre C1'-C4' que se han eliminado (es decir, el enlace covalente carbono-oxígeno-carbono entre los carbonos C1' y C4'). En otro ejemplo, se ha eliminado el enlace C2'-C3' (es decir, el enlace covalente carbono-carbono entre los carbonos C2' y C3') del azúcar (ver *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) y Fluiter *et al.*, *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039 incorporado en el presente documento como referencia).

Las publicaciones estadounidenses representativas que enseñan la preparación de UNA incluyen, entre otras, la patente estadounidense n° 8.314.227; y publicaciones de patentes de EE. UU.

Nos. 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Las modificaciones potencialmente estabilizadoras de los extremos de oligonucleótidos, por ejemplo, ARN, pueden incluir moléculas de N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxirolinol (Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxirolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-0-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"-fosfato, base invertida dT(idT) y otros. La divulgación de esta modificación se puede encontrar en la publicación PCT número WO 2011/005861.

Otras modificaciones de los nucleótidos de, por ejemplo, un agente de ARNbc o un agente de polinucleótido antisentido, de la invención incluyen un fosfato 5' o un imitador de fosfato 5', por ejemplo, un fosfato terminal 5' o un imitador de fosfato en la cadena antisentido de un ARNi. Los imitadores de fosfato adecuados se describen, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2012/0157511, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

iv. ARNi modificados que comprenden motivos de la invención

En ciertos aspectos de la invención, los agentes de ARN bicatenario de la invención incluyen agentes con modificaciones químicas como se describe, por ejemplo, en el documento WO2013/075035, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia. Como se muestra en el presente documento y en el documento WO2013/075035, se pueden introducir uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en una cadena sentido o antisentido de un agente de ARNbci, particularmente en o cerca del sitio de escisión. En algunas realizaciones, la cadena sentido y la cadena antisentido del agente ARNbci pueden modificarse completamente de otro modo. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la cadena sentido o antisentido. El agente ARNbci puede conjugarse opcionalmente con un ligando derivado de GalNAc, por ejemplo en la cadena sentido.

Más específicamente, cuando la cadena sentido y la cadena antisentido del agente de ARN bicatenario se modifican completamente para tener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de al menos una cadena de un agente de ARNbci, se observó la actividad de silenciamiento genético del agente ARNbci.

Por consiguiente, la invención proporciona agentes de ARN bicatenario capaces de inhibir la expresión de un gen diana (es decir, gen INHBE) *in vivo*. El agente de ARNi comprende una cadena sentido y una cadena antisentido. Cada cadena del agente de ARNi puede tener, por ejemplo, 17-30 nucleótidos de longitud, 25-30 nucleótidos de longitud, 27-30 nucleótidos de longitud, 19-25 nucleótidos de longitud, 19-23 nucleótidos de longitud, 19-21 nucleótidos de longitud, 21-25 nucleótidos de longitud, o 21 -23 nucleótidos de longitud.

La cadena sentido y la cadena antisentido normalmente forman un ARN bicatenario dúplex ("ARNbc"), también denominado en el presente documento "agente ARNbci". La región dúplex de un agente de ARNbc puede ser, por ejemplo, la región dúplex puede tener una longitud de 27-30 pares de nucleótidos, una longitud de 19-25 pares de nucleótidos, una longitud de 19-23 pares de

nucleótidos, una longitud de 19-21 pares de nucleótidos, 21-25 pares de nucleótidos de longitud, o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona entre 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En determinadas realizaciones, el agente ARNbci puede contener una o más regiones salientes o grupos de protección en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos de una o ambas cadenas. El saliente puede tener, independientemente, 1-6 nucleótidos de longitud, por ejemplo 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud o 1-2 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, las regiones salientes pueden incluir regiones salientes extendidas como se proporciona anteriormente. Los salientes pueden ser el resultado de que un cadena sea más largo que el otro, o el resultado de que dos cadenas de la misma longitud estén escalonados. El saliente puede formar una falta de coincidencia con el ARNm diana o puede ser complementario de las secuencias genéticas a las que se dirige o puede ser otra secuencia. La primera y segunda cadenas también pueden unirse, por ejemplo, mediante bases adicionales para formar una horquilla, o mediante otros enlaces que no son bases.

En determinadas realizaciones, los nucleótidos en la región saliente del agente ARNbci pueden ser cada uno independientemente un nucleótido modificado o no modificado que incluye, entre otros, 2'-azúcar modificado, tal como, 2'-F, 2'-O-metilo, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo) y cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, TT puede ser una secuencia saliente para cualquiera de los extremos de cualquier cadena. El saliente puede formar una falta de coincidencia con el ARNm diana o puede ser complementario de las secuencias genéticas a las que se dirige o puede ser otra secuencia.

Los salientes 5' o 3' de la cadena sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas del agente ARNbci pueden estar fosforilados. En algunas realizaciones, la(s) región(es) sobresaliente(s) contiene(n) dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En algunas realizaciones, el saliente está presente en el extremo 3' de la cadena sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas. En algunas realizaciones, este saliente 3' está presente en la cadena antisentido. En algunas realizaciones, este saliente 3' está presente en la cadena sentido.

El agente ARNbci puede contener solo un saliente, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNi, sin afectar su estabilidad general. Por ejemplo, el saliente monocatenario puede estar situado en el extremo 3' de la cadena sentido o, alternativamente, en el extremo 3' de la cadena antisentido. El ARNi también puede tener un extremo romo, situado en el extremo 5' de la cadena antisentido (es decir, el extremo 3' de la cadena sentido) o *viceversa*. Generalmente, la cadena antisentido del agente ARNbci tiene un saliente de nucleótido en el extremo 3' y el extremo 5' es romo. Si bien no deseamos limitarnos a ninguna teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la cadena antisentido y el saliente del extremo 3' de la cadena antisentido favorecen la carga de la cadena guía en el proceso RISC.

En determinadas realizaciones, el agente ARNbci tiene dos extremos romos de 19 nucleótidos de longitud, en el que la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 desde el extremo 5'. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12 y 13 desde el extremo 5'.

En otras realizaciones, el agente ARNbci tiene dos extremos romos de 20 nucleótidos de longitud, en el que la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9 y 10 desde el extremo 5'. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12 y 13 desde el extremo 5'.

En otras realizaciones más, el agente ARNbci es un doble extremo romo de 21 nucleótidos de longitud, en el que la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10 y 11 desde el extremo 5'. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12 y 13 desde el extremo 5'.

En ciertas realizaciones, el agente ARNbci comprende una cadena sentido de 21 nucleótidos y una cadena antisentido de 23 nucleótidos, en donde la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10 y 11 desde el extremo 5'; la cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12 y 13 desde el extremo 5', en donde un extremo del agente de ARNi es romo, mientras que el otro extremo comprende un saliente de 2 nucleótidos. En una realización, el saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3' de la cadena antisentido.

Cuando el saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3' de la cadena antisentido, puede haber dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos salientes y el tercer nucleótido es un nucleótido emparejado al lado del nucleótido saliente. En una realización, el agente de ARNi tiene además dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5' de la cadena sentido como en el extremo 5' de la cadena antisentido. En determinadas realizaciones, cada nucleótido de la cadena sentido y la cadena antisentido del agente ARNbci, incluidos los nucleótidos que forman parte de los motivos, son nucleótidos modificados. En determinadas realizaciones, cada residuo se modifica independientemente con un 2'-O-metilo o 3'-fluoro, por ejemplo, en un motivo alterno. Opcionalmente, el agente ARNbci comprende además un ligando (tal como GalNAc₃).

En ciertas realizaciones, el agente ARNbci comprende una cadena sentido y antisentido, en donde la cadena sentido tiene 25-30 residuos de nucleótidos de longitud, en donde a partir del nucleótido 5' terminal (posición 1), las posiciones 1 a 23 de la primera cadena comprenden al menos al menos 8 ribonucleótidos; la cadena antisentido tiene una longitud de 36-66 residuos de nucleótidos y, comenzando desde el nucleótido terminal 3', comprende al menos 8 ribonucleótidos en las posiciones emparejadas con las posiciones 1-23 de la cadena sentido para formar un dúplex; en el que al menos el nucleótido terminal 3' de la cadena antisentido no está apareado con la cadena sentido, y hasta 6 nucleótidos terminales 3' consecutivos no están apareados con la cadena sentido, formando así

un saliente monocatenario 3' de 1-6 nucleótidos; en el que el extremo 5' de la cadena antisentido comprende de 10 a 30 nucleótidos consecutivos que no están apareados con la cadena sentido, formando así un saliente 5' monocatenario de 10 a 30 nucleótidos; en el que al menos los nucleótidos 5' terminales y 3' terminales de la cadena sentido tienen pares de bases con nucleótidos de la cadena antisentido cuando las cadenas sentido y antisentido están alineadas para máxima complementariedad, formando así una región sustancialmente dúplex entre las cadenas sentido y antisentido; y la cadena antisentido es suficientemente complementaria a un ARN diana a lo largo de al menos 19 ribonucleótidos de longitud de la cadena antisentido para reducir la expresión del gen diana cuando el ácido nucleico bicatenario se introduce en una célula de mamífero; y en el que la cadena sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos, en el que al menos uno de los motivos se produce en o cerca del sitio de escisión. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión.

En ciertas realizaciones, el agente ARNbci comprende cadenas sentido y antisentido, en donde el agente ARNbci comprende una primera cadena que tiene una longitud que es de al menos 25 y como máximo 29 nucleótidos y una segunda cadena que tiene una longitud que es como máximo 30 nucleótidos con al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en la posición 11, 12, 13 desde el extremo 5'; en donde el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena forman un extremo romo y la segunda cadena es de 1 a 4 nucleótidos más larga en su extremo 3' que la primera cadena, en donde la región dúplex que es al menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda cadena es suficientemente complementaria a un ARNm diana a lo largo de al menos 19 nucleótidos de la longitud de la segunda cadena para reducir la expresión del gen diana cuando el agente de ARNi se introduce en una célula de mamífero, y en el que la escisión con Dicer del agente de ARNbc da como resultado un ARNip que comprende el extremo 3' de la segunda cadena, reduciendo así la expresión del gen diana en el mamífero. Opcionalmente, el agente ARNbci comprende además un ligando.

En ciertas realizaciones, la cadena sentido del agente ARNbci contiene al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos ocurre en el sitio de escisión en la cadena sentido.

En ciertas realizaciones, la cadena antisentido del agente ARNbci también puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos ocurre en o cerca del sitio de escisión en la cadena antisentido.

Para un agente ARNbci que tiene una región dúplex de 19 a 23 nucleótidos de longitud, el sitio de escisión de la cadena antisentido suele estar alrededor de las posiciones 10, 11 y 12 desde el extremo 5'. Así, los motivos de tres modificaciones idénticas pueden aparecer en las posiciones 9, 10, 11; las posiciones 10, 11, 12; las posiciones 11, 12, 13; las posiciones 12, 13, 14; o las posiciones 13, 14, 15 de la cadena antisentido, el recuento comenzando desde el primer nucleótido del extremo 5' de la cadena antisentido, o el recuento comenzando desde el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex desde el extremo 5' de la cadena antisentido. El sitio de escisión en la cadena

antisentido también puede cambiar según la longitud de la región dúplex del agente ARN_{bci} desde el extremo 5'.

La cadena sentido del agente ARN_{bci} puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión de la cadena; y la cadena antisentido puede tener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en o cerca del sitio de escisión de la cadena. Cuando la cadena sentido y la cadena antisentido forman un dúplex de ARN_{bci}, la cadena sentido y la cadena antisentido pueden alinearse de manera que un motivo de los tres nucleótidos en la cadena sentido y un motivo de los tres nucleótidos en la cadena antisentido tengan al menos una superposición de nucleótidos, es decir, al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la cadena sentido forma un par de bases con al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la cadena antisentido. Alternativamente, al menos dos nucleótidos pueden superponerse, o pueden superponerse los tres nucleótidos.

En algunas realizaciones, la cadena sentido del agente ARN_{bci} puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo puede ocurrir en o cerca del sitio de escisión de la cadena y los otros motivos pueden ser una modificación del ala. El término "modificación de ala" en el presente documento se refiere a un motivo que se produce en otra porción de la cadena que está separada del motivo en o cerca del sitio de escisión de la misma cadena. La modificación del ala es adyacente al primer motivo o está separada por al menos uno o más nucleótidos. Cuando los motivos son inmediatamente adyacentes entre sí, entonces las químicas de los motivos son distintas entre sí, y cuando los motivos están separados por uno o más nucleótidos, las químicas pueden ser iguales o diferentes. Pueden estar presentes dos o más modificaciones del ala. Por ejemplo, cuando están presentes dos modificaciones de ala, cada modificación de ala puede ocurrir en un extremo con respecto al primer motivo que está en o cerca del sitio de escisión o a cualquier lado del motivo principal.

Al igual que la cadena sentido, la cadena antisentido del agente ARN_{bci} puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, ocurriendo al menos uno de los motivos en o cerca del sitio de escisión de la cadena. Esta cadena antisentido también puede contener una o más modificaciones de ala en una alineación similar a las modificaciones de ala que pueden estar presentes en la cadena sentido.

En algunas realizaciones, la modificación del ala en la cadena sentido o cadena antisentido del agente ARN_{bci} normalmente no incluye uno o dos primeros nucleótidos terminales en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos de la cadena.

En otras realizaciones, la modificación del ala en la cadena sentido o cadena antisentido del agente ARN_{bci} normalmente no incluye uno o dos primeros nucleótidos emparejados dentro de la región dúplex en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos de la cadena.

Cuando la cadena sentido y la cadena antisentido del agente ARN_{bci} contienen cada una al menos una modificación de ala, las modificaciones de ala pueden caer en el mismo extremo de la región dúplex y tener una superposición de uno, dos o tres nucleótidos.

Cuando la cadena sentido y la cadena antisentido del agente ARN_{bci} contienen cada una al menos dos modificaciones de ala, la cadena sentido y la cadena antisentido pueden alinearse de modo

que dos modificaciones de cada una de una cadena caigan en un extremo de la región dúplex, teniendo una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones cada una de una cadena caen en el otro extremo de la región dúplex, teniendo una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; En dos modificaciones, una cadena cae a cada lado del motivo principal y tiene una superposición de uno, dos o tres nucleótidos en la región dúplex.

En algunas realizaciones, se puede modificar cada nucleótido de la cadena sentido y la cadena antisentido del agente ARN_{bci}, incluidos los nucleótidos que forman parte de los motivos. Cada nucleótido puede modificarse con la misma o diferente modificación que puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos oxígenos de fosfato no enlazantes o de uno o más de los oxígenos de fosfato enlazantes; alteración de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del 2'-hidroxilo del azúcar ribosa; sustitución total de la fracción fosfato con enlaces "desfosfo"; modificación o reemplazo de una base natural; y sustitución o modificación de la estructura principal de ribosa-fosfato.

Como los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones se producen en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base, o de un resto fosfato, o de un O no enlazante de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones en cuestión en el ácido nucleico, pero en muchos casos no será así. A modo de ejemplo, una modificación solo puede ocurrir en una posición terminal 3' o 5', puede ocurrir solo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena. Puede ocurrir una modificación en una región bicatenaria, en una región monocatenaria o en ambas. Una modificación puede ocurrir sólo en la región bicatenaria de un ARN o puede ocurrir solo en una región monocatenaria de un ARN. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición O no enlazante puede ocurrir solo en uno o ambos extremos, puede ocurrir solo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en regiones de doble cadena y de cadena simple, particularmente en los extremos. El extremo o extremos 5' pueden estar fosforilados.

Puede ser posible, por ejemplo, mejorar la estabilidad, incluir bases particulares en salientes, o incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en salientes monocatenarios, por ejemplo, en un saliente 5' o 3', o en ambos. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en los salientes. En algunas realizaciones, todas o algunas de las bases en un saliente 3' o 5' pueden modificarse, por ejemplo, con una modificación descrita en el presente documento. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar ribosa con modificaciones que se conocen en la técnica, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'-F) o 2'-O-metilo modificado en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones de fosforotioato. No es necesario que los salientes sean homólogos con la secuencia diana.

En algunas realizaciones, cada residuo de la cadena sentido y la cadena antisentido se modifica independientemente con LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo o 2'-fluoro. Las cadenas pueden contener más de una

modificación. En una realización, cada residuo de la cadena sentido y la cadena antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro.

Normalmente están presentes al menos dos modificaciones diferentes en la cadena sentido y en la cadena antisentido. Esas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2'-O-metilo o 2'-fluoro, u otras.

En ciertas realizaciones, N_a o N_b comprenden modificaciones de un patrón alterno. El término "motivo alterno" como se usa en el presente documento se refiere a un motivo que tiene una o más modificaciones, ocurriendo cada modificación en nucleótidos alternos de una cadena. El nucleótido alterno puede referirse a uno cada dos nucleótidos o uno cada tres nucleótidos, o un patrón similar.

Por ejemplo, si A, B y C representan cada uno un tipo de modificación del nucleótido, el motivo alterno puede ser "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAB...", "AAABBBAAABBB..." o "ABCABCABCABC...", etc.

El tipo de modificaciones contenidas en el motivo alterno puede ser igual o diferente. Por ejemplo, si A, B, C, D representan cada uno un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alterno, es decir, modificaciones en cada dos nucleótidos, puede ser el mismo, pero cada una de las cadenas sentido o antisentido puede seleccionarse de varias posibilidades de modificaciones dentro del motivo alterno como "ABABAB...", "ACACAC..." "BDBDBD..." o "CDCDCD...", etc.

En algunas realizaciones, el agente ARN_{bci} de la invención comprende que el patrón de modificación para el motivo alterno en la cadena sentido está desplazado con respecto al patrón de modificación para el motivo alterno en la cadena antisentido. El cambio puede ser tal que el grupo modificado de nucleótidos de la cadena sentido corresponda a un grupo modificado de manera diferente de nucleótidos de la cadena antisentido y *viceversa*. Por ejemplo, cuando la cadena sentido se empareja con la cadena antisentido en el dúplex de ARN_{bci}, el motivo alterno en la cadena sentido puede comenzar con "ABABAB" de 5' a 3' de la cadena y el motivo alterno en la cadena antisentido puede comenzar con "BABABA" de 5' a 3' de la cadena dentro de la región dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alterno en la cadena sentido puede comenzar con "AABBAABB" de 5' a 3' de la cadena y el motivo alterno en la cadena antisentido puede comenzar con "BBAABBAA" de 5' a 3' de la cadena dentro la región dúplex, de modo que hay un cambio completo o parcial de los patrones de modificación entre la cadena sentido y la cadena antisentido.

En algunas realizaciones, el agente ARN_{bci} comprende el patrón del motivo alterno de modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la cadena sentido inicialmente tiene un desplazamiento con respecto al patrón del motivo alterno de 2'-O- modificación con metilo y modificación 2'-F en la cadena antisentido inicialmente, es decir, el nucleótido modificado con 2'-O-metilo en la base de la cadena con sentido se empareja con un nucleótido modificado 2'-F en la cadena antisentido y *viceversa*. La posición 1 de la cadena sentido puede comenzar con la modificación 2'-F, y la posición 1 de la cadena antisentido puede comenzar con la modificación 2'-O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en la cadena sentido o cadena antisentido interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la cadena sentido o cadena antisentido. Esta interrupción del patrón de modificación de la cadena sentido o antisentido mediante la introducción de uno o más motivos de tres modificaciones

idénticas en tres nucleótidos consecutivos en la cadena sentido o antisentido puede mejorar la actividad silenciadora del gen contra el gen diana.

En algunas realizaciones, cuando el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos se introduce en cualquiera de las cadenas, la modificación del nucleótido junto al motivo es una modificación diferente a la modificación del motivo. Por ejemplo, la porción de la secuencia que contiene el motivo es "...N_aYYYN_b...", donde "Y" representa la modificación del motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y "N_a" y "N_b". representan una modificación del nucleótido junto al motivo "YYY" que es diferente a la modificación de Y, y donde N_a y N_b pueden ser modificaciones iguales o diferentes. Alternativamente, N_a o N_b pueden estar presentes o ausentes cuando hay presente una modificación del ala.

El ARNi puede comprender además al menos un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato. La modificación del enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato puede ocurrir en cualquier nucleótido de la cadena sentido, cadena antisentido o ambas cadenas en cualquier posición de la cadena. Por ejemplo, la modificación del enlace internucleotídico puede ocurrir en cada nucleótido de la cadena sentido o antisentido; cada modificación del enlace internucleotídico puede ocurrir en un patrón alterno en la cadena sentido o antisentido; o la cadena sentido o antisentido puede contener ambas modificaciones de enlace internucleotídico en un patrón alterno. El patrón alterno de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena sentido puede ser igual o diferente de la cadena antisentido, y el patrón alterno de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena sentido puede tener un desplazamiento con respecto al patrón alterno de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena antisentido. En una realización, un agente de ARNi bicatenario comprende de 6 a 8 enlaces internucleotídicos de fosforotioato. En algunas realizaciones, la cadena antisentido comprende dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 3', y la cadena sentido comprende al menos dos enlaces internucleotídicos fosforotioato en el extremo 5' o en el extremo 3'.

En algunas realizaciones, el agente ARN_{bci} comprende una modificación del enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato en la región saliente. Por ejemplo, la región saliente puede contener dos nucleótidos que tienen un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato entre los dos nucleótidos. También se pueden realizar modificaciones de enlaces internucleotídicos para unir los nucleótidos sobresalientes con los nucleótidos pares terminales dentro de la región dúplex. Por ejemplo, al menos 2, 3, 4 o todos los nucleótidos salientes pueden estar unidos a través de un enlace internucleotídico fosforotioato o metilfosfonato, y opcionalmente, puede haber enlaces internucleotídicos de fosforotioato o metilfosfonato adicionales que unen el nucleótido saliente con un nucleótido emparejado que está al lado del nucleótido saliente. Por ejemplo, puede haber al menos dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en los que dos de los tres nucleótidos son nucleótidos salientes y el tercero es un nucleótido emparejado junto al nucleótido saliente. Estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3' de la cadena antisentido, en el extremo 3' de la cadena sentido, en el extremo 5' de la cadena antisentido o en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En algunas realizaciones, el saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3' de la cadena antisentido, y hay dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos salientes, y el tercer nucleótido es un nucleótido emparejado al lado del nucleótido saliente. Opcionalmente, el agente ARN_{bci} puede tener

5 adicionalmente dos enlaces internucleotídicos fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5' de la cadena sentido como en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En una realización, el agente ARN_{bci} comprende discrepancias con la diana, dentro del dúplex, o combinaciones de los mismos. La falta de coincidencia puede ocurrir en la región saliente o en la región dúplex. El par de bases se puede clasificar según su propensión a promover la disociación o la fusión (por ejemplo, según la energía libre de asociación o disociación de un par particular, el enfoque más simple es examinar los pares individualmente, aunque también se puede utilizar un análisis del vecino más próximo u otro similar). En términos de promover la disociación: se prefiere A:U a G:C; Se prefiere G:U a G:C; y se prefiere I:C a G:C (I=inosina). Los desajustes, por ejemplo, emparejamientos no canónicos o distintos de los canónicos (como se describe en otra parte del

10 o la fusión (por ejemplo, según la energía libre de asociación o disociación de un par particular, el enfoque más simple es examinar los pares individualmente, aunque también se puede utilizar un análisis del vecino más próximo u otro similar). En términos de promover la disociación: se prefiere A:U a G:C; Se prefiere G:U a G:C; y se prefiere I:C a G:C (I=inosina). Los desajustes, por ejemplo, emparejamientos no canónicos o distintos de los canónicos (como se describe en otra parte del presente documento) se prefieren a los emparejamientos canónicos (A:T, A:U, G:C); y se prefieren los emparejamientos que incluyen una base universal a los emparejamientos canónicos.

En ciertas realizaciones, el agente ARN_{bci} comprende al menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases dentro de las regiones dúplex del extremo 5' de la cadena antisentido seleccionada independientemente del grupo de: A:U, G:U, I:C y pares no coincidentes, por ejemplo,

20 emparejamientos no canónicos o no canónicos o emparejamientos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la cadena antisentido en el extremo 5' del dúplex.

En determinadas realizaciones, el nucleótido en la posición 1 dentro de la región dúplex del extremo 5' en la cadena antisentido se selecciona entre A, dA, dU, U y dT. Alternativamente, al menos uno de los primeros 1, 2 o 3 pares de bases dentro de la región dúplex del extremo 5' de la cadena antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases dentro de la región dúplex del extremo 5' de la cadena antisentido es un par de bases AU.

25

En otras realizaciones, el nucleótido en el extremo 3' de la cadena sentido es desoxitimidina (dT) o el nucleótido en el extremo 3' de la cadena antisentido es desoxitimidina (dT). Por ejemplo, hay una secuencia corta de nucleótidos de desoxitimidina, por ejemplo, dos nucleótidos dT en el extremo

30 3' de la cadena sentido, antisentido o ambas cadenas.

En determinadas realizaciones, la secuencia de la cadena sentido puede representarse mediante la fórmula (I):

$$5' n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y -N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3' \quad (I)$$

donde:

i y j son cada uno independientemente 0 ó 1;

p y q son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende de 0 a 25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende de 0 a 10 nucleótidos modificados;

cada n_p y n_q representan independientemente un nucleótido sobresaliente;

donde N_b e Y no tienen la misma modificación; y

5 XXX, YYY y ZZZ representan cada uno de forma independiente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. En una realización, YYY son todos los nucleótidos modificados en 2'-F.

En algunas realizaciones, N_a o N_b comprende modificaciones de patrón alterno.

10 En algunas realizaciones, el motivo YYY aparece en o cerca del sitio de escisión de la cadena sentido. Por ejemplo, cuando el agente ARN_{bci} tiene una región dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY puede aparecer en el sitio de escisión o en sus proximidades (p. ej., puede aparecer en las posiciones 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12; o 11, 12, 13) de la cadena sentido, comenzando el recuento desde el primer nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, el recuento comienza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex, desde el extremo

15 5'.

En una realización, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o tanto i como j son 1. Por lo tanto, la cadena sentido puede representarse mediante las siguientes fórmulas:

5' n_p - N_a -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Ib);

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_a - n_q 3' (Ic); o

20 5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Id).

Cuando la cadena sentido está representada por la fórmula (Ib), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

25 Cuando la cadena sentido se representa como fórmula (Ic), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 modificados. nucleótidos. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena sentido se representa como fórmula (Id), cada N_b representa

30 independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. En una realización, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X, Y y Z puede ser igual o diferente entre sí.

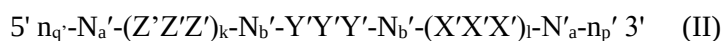
35 En otras realizaciones, i es 0 y j es 0, y la cadena sentido puede representarse mediante la fórmula:

5' n_p - N_a -YYY- N_a - n_q 3' (Ia).

Cuando la cadena sentido está representada por la fórmula (Ia), cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos

40 modificados.

En una realización, la secuencia de la cadena antisentido del ARNi puede representarse mediante la fórmula (II):



donde:

5 k y l son cada uno independientemente 0 ó 1;

p' y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende de 0 a 25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

10 cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada n_p' y n_q' representan independientemente un nucleótido saliente;

en donde N_b' e Y' no tienen la misma modificación; y

15 X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno de forma independiente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

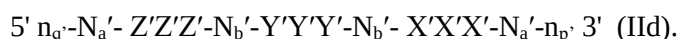
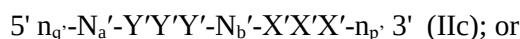
En algunas realizaciones, N_a' o N_b' comprende modificaciones de patrón alterno.

El motivo Y'Y'Y' ocurre en o cerca del sitio de escisión de la cadena antisentido. Por ejemplo, cuando el agente ARN_{bci} tiene una región dúplex de 17 a 23 nucleótidos de longitud, el motivo Y'Y'Y' puede aparecer en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la
20 cadena antisentido, comenzando el recuento desde el primer nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, el recuento comienza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5'. En una realización, el motivo Y'Y'Y' aparece en las posiciones 11, 12, 13.

En determinadas realizaciones, el motivo Y'Y'Y' son todos nucleótidos modificados con 2'-OMe.

25 En determinadas realizaciones, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o tanto k como l son 1.

Por tanto, la cadena antisentido puede representarse mediante las siguientes fórmulas:



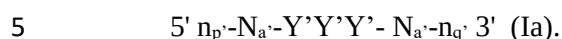
30 Cuando la cadena antisentido está representada por la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

35 Cuando la cadena antisentido se representa como fórmula (IIc), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0. nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

40 Cuando la cadena antisentido se representa como fórmula (IId), cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de

oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. En una realización, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otras realizaciones, k es 0 y l es 0 y la cadena antisentido puede representarse mediante la fórmula:



Cuando la cadena antisentido se representa como fórmula (IIa), cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X' , Y' y Z' puede ser igual o diferente entre sí.

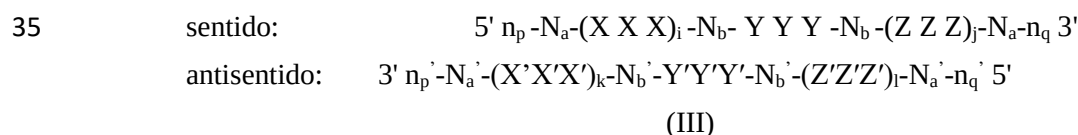
Cada nucleótido de la cadena sentido y antisentido puede modificarse independientemente con LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C- alilo, 2'-hidroxilo o 2'-fluoro. Por ejemplo, cada nucleótido de la cadena sentido y de la cadena antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Cada X , Y , Z , X' , Y' y Z' , en particular, puede representar una modificación 2'-O-metilo o una modificación 2'-fluoro.

En algunas realizaciones, la cadena sentido del agente ARN_{bci} puede contener el motivo YYY que aparece en las posiciones 9, 10 y 11 de la cadena cuando la región dúplex es de 21 nt, comenzando el recuento desde el primer nucleótido del extremo 5', u opcionalmente, el recuento comienza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5'; e Y representa la modificación 2'-F. La cadena sentido puede contener adicionalmente motivos XXX o motivos ZZZ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y XXX y ZZZ representan cada uno independientemente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

En algunas realizaciones, la cadena antisentido puede contener el motivo Y'Y'Y' que aparece en las posiciones 11, 12, 13 de la cadena, el recuento comienza desde el primer nucleótido desde el extremo 5' u, opcionalmente, el recuento comienza en el primer nucleótido emparejado. nucleótido dentro de la región dúplex, desde el extremo 5'; e Y' representa modificación 2'-O-metilo. La cadena antisentido puede contener adicionalmente motivos X'X'X' o motivos Z'Z'Z' como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y X'X'X' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

La cadena sentido representada por cualquiera de las fórmulas anteriores (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) forma un dúplex con una cadena antisentido representada por cualquiera de las fórmulas (IIa), (IIb), (IIc) y (IId), respectivamente.

Por consiguiente, los agentes de ARN_{bci} para uso en los métodos de la invención pueden comprender una cadena sentido y una cadena antisentido, teniendo cada cadena de 14 a 30 nucleótidos, estando el dúplex de ARN_i representado por la fórmula (III):



donde:

i , j , k y l son cada uno independientemente 0 ó 1;

p , p' , q y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a y N_a' representan independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende de 0 a 25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

en el que cada n_p' , n_p , n_q' , y n_q , cada uno de los cuales puede estar presente o no, representa independientemente un nucleótido saliente; y

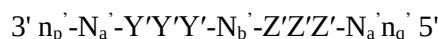
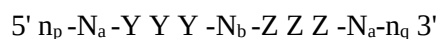
XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ y $Z'Z'Z'$ representan cada uno de forma independiente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

En una realización, i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o tanto i como j son 0; o tanto i como j son 1. En otra realización, k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; k es 0 es 1; o tanto k como l son 0; o tanto k como l son 1.

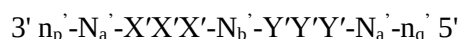
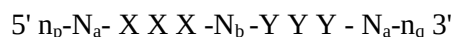
Las combinaciones ejemplares de la cadena sentido y la cadena antisentido que forman un dúplex de ARNi incluyen las fórmulas siguientes:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

Cuando el agente ARNbci está representado por la fórmula (IIIa), cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente ARNbci está representado por la fórmula (IIIb), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-10, 1-7, 1-5 o 1-4 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente ARNbci se representa como fórmula (IIIc), cada N_b , N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente ARNbci se representa como fórmula (IIId), cada N_b , N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a , N_a' representa independientemente una secuencia de

oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a , N_a' , N_b , y N_b' comprende independientemente modificaciones de patrón alterno.

Cada uno de X, Y y Z en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) pueden ser iguales o diferentes entre sí.

5 Cuando el agente ARNbci está representado por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), al menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Y'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos Y forman pares de bases con los nucleótidos Y' correspondientes; o los tres nucleótidos Y forman pares de bases con los nucleótidos Y' correspondientes.

10 Cuando el agente ARNbci está representado por la fórmula (IIIb) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos Z forman pares de bases con los nucleótidos Z' correspondientes; o los tres nucleótidos Z forman pares de bases con los nucleótidos Z' correspondientes.

15 Cuando el agente ARNbci se representa como fórmula (IIIc) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos X forman pares de bases con los nucleótidos X' correspondientes; o los tres nucleótidos X forman pares de bases con los nucleótidos X' correspondientes.

20 En determinadas realizaciones, la modificación del nucleótido Y es diferente de la modificación del nucleótido Y', la modificación del nucleótido Z es diferente de la modificación del nucleótido Z', o la modificación del nucleótido X es diferente de la modificación en el nucleótido X'.

25 En determinadas realizaciones, cuando el agente ARNbci está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-fluoro. En otras realizaciones, cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-fluoro y $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino a través del enlace fosforotioato. En otras realizaciones más, cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un vecino. nucleótido mediante un enlace fosforotioato, y la cadena sentido se conjuga con uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado bivalente o trivalente (descrito a continuación). En otras realizaciones, cuando el agente de

30 ARNi está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante un enlace fosforotioato, la cadena sentido comprende al menos un enlace fosforotioato, y la cadena sentido se conjuga con uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado bivalente o trivalente.

35 En algunas realizaciones, cuando el agente ARNbci está representado por la fórmula (IIIa), las modificaciones N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino. mediante un enlace fosforotioato, la cadena sentido comprende al menos un enlace fosforotioato, y la cadena sentido se conjuga con uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado bivalente o trivalente.

En algunas realizaciones, el agente ARN_{bci} es un multímero que contiene al menos dos dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), en donde los dúplex están conectados por un enlace. El enlace puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede apuntar al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.

En algunas realizaciones, el agente ARN_{bci} es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), en la que los ARN_{bci} son conectados por un enlace. El enlace puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede apuntar al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.

En una realización, dos agentes de ARN_{bc} representados por al menos una de las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) están unidos entre sí en el extremo 5', y uno o ambos de los extremos 3' y opcionalmente están conjugados con un ligando. Cada uno de los agentes puede atacar el mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.

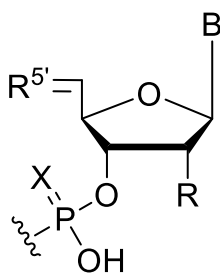
En determinadas realizaciones, un agente de ARN_i de la invención puede contener un número bajo de nucleótidos que contienen una modificación 2'-fluoro, por ejemplo, 10 o menos nucleótidos con modificación 2'-fluoro. Por ejemplo, el agente de ARN_i puede contener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro. En una realización específica, el agente de ARN_i de la invención contiene 10 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro, por ejemplo, 4 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena sentido y 6 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena antisentido. En otra realización específica, el agente de ARN_i de la invención contiene 6 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro, por ejemplo, 4 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena sentido y 2 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena antisentido.

En otras realizaciones, un agente de ARN_i de la invención puede contener un número ultra bajo de nucleótidos que contienen una modificación 2'-fluoro, por ejemplo, 2 o menos nucleótidos que contienen una modificación 2'-fluoro. Por ejemplo, el agente de ARN_i puede contener 2, 1 de 0 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro. En una realización específica, el agente de ARN_i puede contener 2 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro, por ejemplo, 0 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena sentido y 2 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena antisentido.

Diversas publicaciones describen ARN_i multiméricos que pueden usarse en los métodos de la invención. Dichas publicaciones incluyen WO2007/091269, Patente de EE. UU. N° 7.858.769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 y WO2011/031520, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

En ciertas realizaciones, las composiciones y métodos de la divulgación incluyen una modificación con fosfonato de vinilo (VP) de un agente de ARN_i como se describe en el presente

documento. En realizaciones ejemplares, un nucleótido modificado con 5' vinilfosfonato de la divulgación tiene la estructura:



en donde X es O o S;

- 5 R es hidrógeno, hidroxilo, fluoro o alcoxi C1-20 (por ejemplo, metoxi o n-hexadeciloxi);
 R^{5'} es =C(H)-P(O)(OH)₂ y el doble enlace entre el carbono C5' y R^{5'} está en la orientación E o Z (por ejemplo, orientación E); y

 B es una nucleobase o una nucleobase modificada, opcionalmente donde B es adenina, guanina, citosina, timina o uracilo.

- 10 Un vinilfosfonato de la presente divulgación se puede unir a la cadena antisentido o sentido de un ARNbc de la divulgación. En ciertas realizaciones, un vinilfosfonato de la presente divulgación se une a la cadena antisentido de un ARNbc, opcionalmente en el extremo 5' de la cadena antisentido del ARNbc.

- También se contemplan modificaciones de vinilfosfonato para las composiciones y métodos de la presente divulgación. Una estructura de vinilfosfonato ejemplar incluye la estructura anterior, donde R^{5'} es =C(H)-OP(O)(OH)₂ y el doble enlace entre el carbono C5' y R^{5'} está en la orientación E o Z (p. ej., orientación E).

- Como se describe con más detalle a continuación, el ARNi que contiene conjugaciones de uno o más restos de carbohidratos con un ARNi puede optimizar una o más propiedades del ARNi. En muchos casos, la fracción de carbohidrato se unirá a una subunidad modificada del ARNi. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótidos de un ARNi se puede reemplazar con otro resto, por ejemplo, un vehículo no carbohidrato (tal como cíclico) al que está unido un ligando de carbohidrato. Una subunidad de ribonucleótido en la que el azúcar ribosa de la subunidad ha sido reemplazado de esta manera se denomina en el presente documento subunidad de modificación de reemplazo de ribosa (RRMS). Un portador cíclico puede ser un sistema de anillos carbocíclico, es decir, todos los átomos del anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillos heterocíclico, es decir, uno o más átomos del anillo pueden ser un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre. El portador cíclico puede ser un sistema de anillos monocíclico o puede contener dos o más anillos, por ejemplo anillos fusionados. El portador cíclico puede ser un sistema de anillos completamente saturado o puede contener uno o más dobles enlaces.

 El ligando puede unirse al polinucleótido mediante un vehículo. Los transportadores incluyen (i) al menos un "punto de unión de la columna vertebral", tal como dos "puntos de unión de la columna vertebral" y (ii) al menos un "punto de unión de anclaje". Un "punto de unión de la estructura

principal", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo funcional, por ejemplo, un grupo hidroxilo, o en general, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del vehículo en la estructura principal, por ejemplo, el fosfato o fosfato modificado. por ejemplo, cadena principal que contiene azufre de un ácido ribonucleico. Un "punto de unión" (TAP) en algunas realizaciones se refiere a un átomo constituyente del anillo del portador cíclico, por ejemplo, un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que proporciona un punto de unión al esqueleto), que conecta un resto seleccionado. El resto puede ser, por ejemplo, un carbohidrato, por ejemplo monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido. Opcionalmente, el resto seleccionado está conectado mediante una unión intermedia al portador cíclico. Por lo tanto, el portador cíclico incluirá a menudo un grupo funcional, por ejemplo, un grupo amino, o generalmente proporcionará un enlace que es adecuado para la incorporación o unión de otra entidad química, por ejemplo, un ligando al anillo constituyente.

El ARNi puede conjugarse con un ligando a través de un vehículo, donde el vehículo puede ser un grupo cíclico o un grupo acíclico. En una realización, el grupo cíclico se selecciona de pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y decalina. En una realización, el grupo acíclico es un esqueleto de serinol o un esqueleto de dietanolamina.

a. Modificaciones térmicamente desestabilizadoras

En determinadas realizaciones, una molécula de ARNbc puede optimizarse para la interferencia de ARN incorporando modificaciones térmicamente desestabilizadoras en la región semilla de la cadena antisentido. Como se usa en el presente documento, "región semilla" significa en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la cadena a la que se hace referencia. Por ejemplo, se pueden incorporar modificaciones térmicamente desestabilizadoras en la región semilla de la cadena antisentido para reducir o inhibir el silenciamiento de genes no diana.

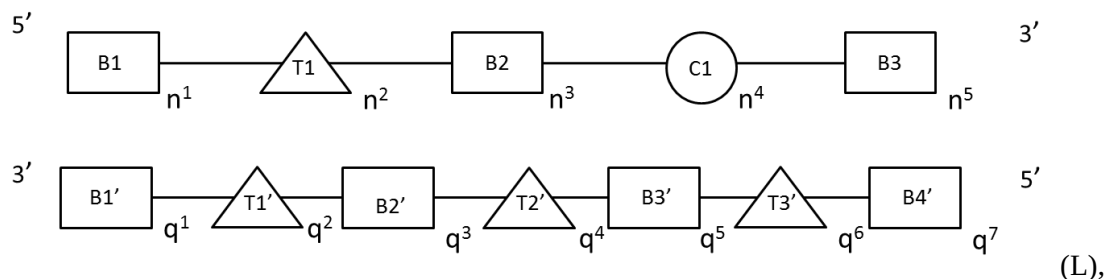
El término "modificación(es) térmicamente desestabilizadora(s)" incluye modificaciones que resultarían con un ARNbc con una temperatura de fusión global (T_m) más baja que la T_m del ARNbc sin tener tales modificaciones. Por ejemplo, las modificaciones térmicamente desestabilizadoras pueden disminuir la T_m del ARNbc entre 1 y 4 °C, como uno, dos, tres o cuatro grados centígrados. Y el término "nucleótido térmicamente desestabilizador" se refiere a un nucleótido que contiene una o más modificaciones térmicamente desestabilizadoras.

Se ha descubierto que los ARNbc con una cadena antisentido que comprende al menos una modificación térmicamente desestabilizadora del dúplex dentro de las primeras 9 posiciones de nucleótidos, contando desde el extremo 5', de la cadena antisentido tienen una actividad silenciadora de genes no diana reducida. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la cadena antisentido comprende al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o más) modificación térmicamente desestabilizadora del dúplex dentro de las primeras 9 posiciones de nucleótidos de la región 5' de la cadena antisentido. En algunas realizaciones, una o más modificaciones térmicamente desestabilizadoras del dúplex están ubicadas en las posiciones 2-9, tales como las posiciones 4-8,

desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En algunas realizaciones adicionales, la modificación térmicamente desestabilizadora del dúplex está situada en la posición 6, 7 u 8 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. Aún en algunas realizaciones adicionales, la modificación térmicamente desestabilizadora del dúplex está situada en la posición 7 desde el extremo 5' de la cadena antisentido.

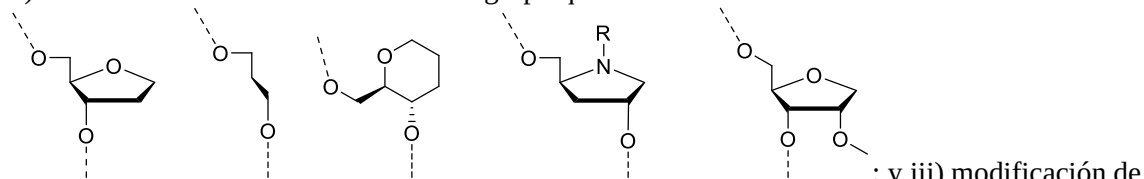
- 5 En algunas realizaciones, la modificación térmicamente desestabilizadora del dúplex está ubicada en la posición 2, 3, 4, 5 o 9 desde el extremo 5' de la cadena antisentido.

Un agente de ARNi comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, teniendo cada cadena de 14 a 40 nucleótidos. El agente de ARNi puede estar representado por la fórmula (L):

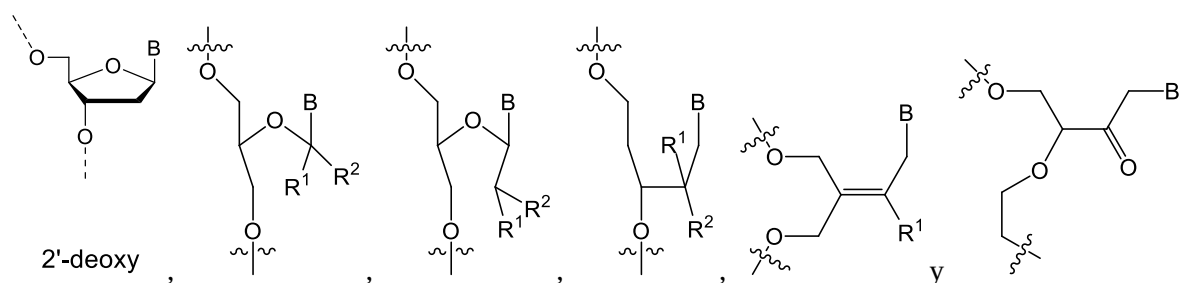


- 10 En la fórmula (L), B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' son cada uno independientemente un nucleótido que contiene una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-alquilo, alcoxi 2'-sustituido, alquilo 2'-sustituido, 2'-halo, ENA y BNA/LNA. En una realización, B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' contienen cada uno modificaciones 2'-OMe. En una realización, B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' contienen cada uno modificaciones 2'-OMe o 2'-F. En una realización, al menos uno de B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' contiene una modificación 2'-ON-metilacetamido (2'-O-NMA, 2'-O-CH₂C(O)N(Me)H).

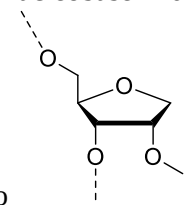
- 20 C1 es un nucleótido térmicamente desestabilizador colocado en un sitio opuesto a la región semilla de la cadena antisentido (es decir, en las posiciones 2-8 del extremo 5' de la cadena antisentido). Por ejemplo, C1 está en una posición de la cadena sentido que se empareja con un nucleótido en las posiciones 2-8 del extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, C1 está en la posición 15 desde el extremo 5' de la cadena sentido. El nucleótido C1 lleva la modificación térmicamente desestabilizadora que puede incluir modificación abásica; falta de coincidencia con el nucleótido opuesto en el dúplex; y modificación de azúcar tal como modificación 2'-desoxi o nucleótido acíclico, por ejemplo, ácidos nucleicos desbloqueados (UNA) o ácido nucleico de glicerol (GNA). En una realización, C1 tiene una modificación térmicamente desestabilizadora seleccionada del grupo que consiste en: i) falta de coincidencia con el nucleótido opuesto en la cadena antisentido; ii) modificación básica seleccionada del grupo que consiste en:



; y iii) modificación de azúcar seleccionada del grupo que consiste en:



en donde B es una nucleobase modificada o no modificada, R_1 y R_2 son independientemente H, halógeno, OR_3 o alquilo; y R_3 es H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar. En una realización, la modificación térmicamente desestabilizadora en C1 es una falta de coincidencia seleccionada del grupo que consiste en G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U., C:T, U:U, T:T y U:T; y opcionalmente, al menos una nucleobase en el par no coincidente es una nucleobase 2'-desoxi.



En un ejemplo, la modificación térmicamente desestabilizadora en C1 es GNA o

T1, T1', T2' y T3' representan cada uno independientemente un nucleótido que comprende una modificación que proporciona al nucleótido un volumen estérico que es menor o igual al volumen estérico de una modificación 2'-OMe. Un volumen estérico se refiere a la suma de los efectos estéricos de una modificación. Los expertos en la técnica conocen métodos para determinar los efectos estéricos de una modificación de un nucleótido. La modificación puede ser en la posición 2' de un azúcar ribosa del nucleótido, o una modificación en un nucleótido no ribosa, un nucleótido acíclico o la columna vertebral del nucleótido que es similar o equivalente a la posición 2' del azúcar ribosa, y proporciona al nucleótido un volumen estérico que es menor o igual al volumen estérico de una modificación 2'-OMe. Por ejemplo, T1, T1', T2' y T3' se seleccionan cada uno independientemente de ADN, ARN, LNA, 2'-F y 2'-F-5'-metilo. En una realización, T1 es ADN. En una realización, T1' es ADN, ARN o LNA. En una realización, T2' es ADN o ARN. En una realización, T3' es ADN o ARN. n^1 , n^3 y q^1 tienen independientemente una longitud de 4 a 15 nucleótidos.

n^5 , q^3 y q^7 tienen de forma independiente entre 1 y 6 nucleótidos de longitud.

n^4 , q^2 y q^6 tienen independientemente 1-3 nucleótidos de longitud; alternatively, n^4 es 0.

q^5 tiene independientemente 0-10 nucleótido(s) de longitud.

n^2 y q^4 tienen independientemente 0-3 nucleótidos de longitud.

Alternativamente, n^4 tiene una longitud de 0 a 3 nucleótidos.

En una realización, n^4 puede ser 0. En un ejemplo, n^4 es 0, y q^2 y q^6 son 1. En otro ejemplo, n^4 es 0, y q^2 y q^6 son 1, con dos internucleótidos de fosforotioato. modificaciones de enlace dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones de enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una realización, n^4 , q^2 y q^6 son cada uno 1.

En una realización, n^2 , n^4 , q^2 , q^4 , y q^6 son cada uno 1.

En una realización, C1 está en la posición 14-17 del extremo 5' de la cadena sentido, cuando la cadena sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^4 es 1. En una realización, C1 está en la posición 15 del extremo 5' de la cadena sentido

En una realización, T3' comienza en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^6 es igual a 1.

En una realización, T1' comienza en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^2 es igual a 1.

En una realización ejemplar, T3' comienza desde la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y T1' comienza desde la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T3' comienza desde la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^6 es igual a 1 y T1' comienza desde la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^2 es igual a 1.

En una realización, T1' y T3' están separados por 11 nucleótidos de longitud (es decir, sin contar los nucleótidos T1' y T3').

En una realización, T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^2 es igual a 1, y la modificación en la posición 2' o posiciones en una cadena principal no ribosa, acíclica o que proporciona menos estérico. mayor que una ribosa 2'-OMe.

En una realización, T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^6 es igual a 1, y la modificación en la posición 2' o posiciones en una cadena principal no ribosa, acíclica o que proporciona menos de o igual al volumen estérico que una ribosa 2'-OMe.

En una realización, T1 está en el sitio de escisión de la cadena sentido. En un ejemplo, T1 está en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena sentido, cuando la cadena sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1. En una realización ejemplar, T1 está en el sitio de escisión de la cadena sentido. cadena sensora en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena sensora, cuando la cadena sensora tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1.

En una realización, T2' comienza en la posición 6 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T2' está en las posiciones 6-10 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^4 es 1.

En una realización ejemplar, T1 está en el sitio de escisión de la cadena sentido, por ejemplo, en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena sentido, cuando la cadena sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1; T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^2 es igual a 1, y la modificación a T1' está en la posición 2' de un azúcar ribosa o en posiciones en un azúcar acíclico no ribosa o columna vertebral que proporciona menos volumen estérico que una ribosa 2'-OMe; T2' está en las posiciones 6-10 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^4 es 1; y T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^6 es

igual a 1, y la modificación a T3' está en la posición 2' o en posiciones en una cadena principal no ribosa, acíclica o que proporcionan un volumen estérico menor o igual que una ribosa 2'-OMe.

En una realización, T2' comienza en la posición 8 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T2' comienza en la posición 8 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q⁴ es 2.

5 En una realización, T2' comienza en la posición 9 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T2' está en la posición 9 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q⁴ es 1.

10 En una realización, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 6, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

15 En una realización, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 6, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

20 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1.

25 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

30 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 6, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 7, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1.

35 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 6, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 7, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1 ; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace

40

internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 6, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 6, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 5, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1; opcionalmente con al menos 2 TT adicionales en el extremo 3' de la cadena antisentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 5, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1; opcionalmente con al menos 2 TT adicionales en el extremo 3' de la cadena antisentido; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1 a 5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5').

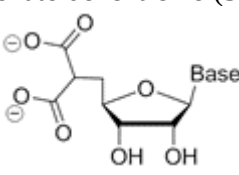
En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F y q^7 es 1.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

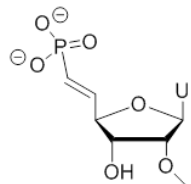
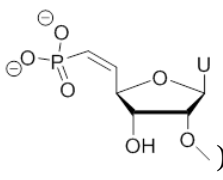
En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

El agente de ARNi puede comprender un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la cadena sentido o antisentido. El grupo que contiene fósforo en el extremo 5' puede ser fosfato en el extremo 5' (5'-P), fosforotioato en el extremo 5' (5'-PS), fosforoditioato en el extremo 5' (5'-PS2), -vinilfosfonato del extremo (5'-VP), metilfosfonato del extremo 5' (MePhos) o 5'-desoxi-5'-C-

malonilo (). Cuando el grupo que contiene fósforo en el extremo 5' es

vinilfosfonato en el extremo 5' (5'-VP), el 5'-VP puede ser el isómero 5'-E-VP (es decir, trans -

vinilfosfonato , 5'- Isómero Z-VP (es decir, cis -vinilfosfonato, , o mezclas de los mismos.

En una realización, el agente de ARNi comprende un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la cadena sentido. En una realización, el agente de ARNi comprende un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-P. En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-P en la cadena antisentido.

En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS. En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS en la cadena antisentido.

En una realización, el agente de ARNi comprende una 5'-VP. En una realización, el agente de ARNi comprende una 5'-VP en la cadena antisentido. En una realización, el agente de ARNi comprende una 5'-E-VP en la cadena antisentido. En una realización, el agente de ARNi comprende una 5'-Z-VP en la cadena antisentido.

5 En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂. En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂ en la cadena antisentido.

En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂. En una realización, el agente de ARNi comprende un 5'-desoxi-5'-C-malonilo en la cadena antisentido.

10 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

15 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

20 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP o una combinación de los mismos.

25 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende una 5'-PS₂.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-C-malonilo.

30 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

35 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con

dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de los mismos.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'- PS₂.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -OMe, y q^7 es 1. El agente ARNi también comprende un 5'-P.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNbc también comprende un 5'-PS.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3

es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1. El agente ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de los mismos.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1. El agente ARNi también comprende una 5'-PS₂.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, n¹ es 8, T1 es 2'F n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de los mismos.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena

sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende una 5'-_{PS2}.

5 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-C-malonilo.

10 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

15 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

20 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP o una combinación de los mismos.

25 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1. El agente de ARN ARN_{bci} también comprende un 5'-_{PS2}.

30 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-C-malonilo.

35 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'-F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico

fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente ARNi también comprende un 5'-P.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'- E - VP, 5'- Z -VP o una combinación de los mismos.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'- PS₂.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1. El agente ARNi también comprende un 5'-P.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1. El agente ARNi también comprende un 5'-PS.

5 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1. El agente ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de los mismos.

10 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1. El agente ARNi también comprende una 5'-PS₂.

15 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo.

20 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente ARNi también comprende un 5'-P.

25 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

30 En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2' -F, y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'

40

de la cadena antisentido). El agente ARNi también comprende una 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'- E - VP, 5'- Z -VP o una combinación de los mismos.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'- PS₂.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2' -F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³

es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'-VP (p. ej., una 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de las mismas) y un ligando de direccionamiento.

En una realización, la 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-desoxi-5'- C -malonilo está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende una 5'-VP (p. ej., una 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de las mismas) y un ligando de direccionamiento. En una realización, la 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 del antisentido cadena (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-desoxi-5'- C -malonilo está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'-VP (p. ej., una 5'- E -VP, 5'- Z -VP o una combinación de las mismas) y un ligando de direccionamiento. En una realización, la 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F y q^7 es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS₂ y un ligando de

direccionamiento. En una realización, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-desoxi-5'- C -malonilo está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende una 5'-VP (p. ej., una 5'- E -VP, 5'-

Z -VP o una combinación de las mismas) y un ligando dirigido. En una realización, la 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1; con dos modificaciones del enlace internucleotídico fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleótido fosforotioato dentro de las posiciones 18- 23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'- C -malonilo y un ligando de direccionamiento. En una realización, el 5'-desoxi-5'- C -malonilo está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena sentido.

En una realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente; y

(iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 17, 19 y 21, y modificaciones 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 12, 14 a 16, 18 y 20 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11 a 13, 15, 17, 19, 21 y 23, y modificaciones 2'F en las posiciones 2, 4, 6 a 8, 10, 14, 16, 18, 20 y 22 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNbc tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

- 5 (i) una longitud de 21 nucleótidos;
- (ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente;
- (iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 15, 17, 19 y 21, y modificaciones 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 y 20 (contando desde el extremo 5'); y
- 10 (iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

- 15 (i) una longitud de 23 nucleótidos;
- (ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, 19 y 21 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 y 20 (contando desde el extremo 5'); y
- (iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');
- 20

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

25 (a) una cadena sentido que tiene:

- (i) una longitud de 21 nucleótidos;
- (ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente;
- (iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8, 10 y 12 a 21, modificaciones 2'-F en las posiciones 7 y 9, y un desoxinucleótido (por ejemplo, dT) en la posición 11 (contando desde el extremo 5'); y
- 30 (iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

35 (b) una cadena antisentido que tiene:

- (i) una longitud de 23 nucleótidos;
- (ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4 a 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');
en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende

tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8, 10, 12, 14 y 16 a 21, y

modificaciones 2'-F en las posiciones 7, 9, 11, 13 y 15; y

(iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 a 23, y

modificaciones 2'-F en las posiciones 2 a 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende

tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 9 y 12 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 10 y 11; y

(iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, 19 y 21 a 23, y

modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente; (iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 a 11 y 13, y modificaciones 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 12 y 14 a 21; y

(iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5 a 7, 9, 11 a 13, 15, 17 a 19 y 21 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4, 8, 10, 14, 16 y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17 y 19 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 16 y 18; y

(iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 25 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 4, 6, 7, 9, 11 a 13, 15, 17 y 19 a 23, modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16 y 18, y desoxinucleótidos (por ejemplo, dT) en las posiciones 24 y 25 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de cuatro nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente; (iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8 y 12 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 7 y 9 a 11; y

(iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 8, 10 a 13, 15 y 17 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6, 9, 14 y 16 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8 y 12 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 7 y 9 a 11; y

(iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 10 a 13, 15 y 17 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 y 16 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');
en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En otra realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una cadena sentido que tiene:

(i) una longitud de 19 nucleótidos;

(ii) un ligando de ASGPR unido al extremo 3', en el que dicho ligando de ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlace ramificado trivalente; (iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 4, 6 y 10 a 19, y modificaciones 2'-F en las posiciones 5 y 7 a 9; y (iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 10 a 13, 15 y 17 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 y 16 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 19 y 20, y entre las posiciones de nucleótidos 20 y 21 (contando desde el extremo 5');

en el que los agentes de ARNi tienen un saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En determinadas realizaciones, el ARNi para uso en los métodos de la invención es un agente seleccionado entre los agentes enumerados en cualquiera de las Tablas 4-5. Estos agentes pueden comprender además un ligando.

v. Agentes polinucleotídicos antisentido que comprenden motivos

En determinadas realizaciones de la invención, al menos uno de los nucleótidos contiguos de los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención puede ser un nucleótido modificado. En una realización, el nucleótido modificado comprende uno o más azúcares modificados. En otras realizaciones, el nucleótido modificado comprende una o más nucleobases modificadas. Aún en otras realizaciones, el nucleótido modificado comprende uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En algunas realizaciones, las modificaciones (modificaciones de azúcar, modificaciones de nucleobases o modificaciones de enlaces) definen un patrón o motivo. En una realización, los patrones de modificaciones de restos de azúcar, enlaces internucleosídicos y nucleobases son independientes entre sí.

Los agentes polinucleotídicos antisentido que tienen oligonucleótidos modificados dispuestos en patrones o motivos pueden, por ejemplo, conferir a los agentes propiedades tales como actividad

inhibidora mejorada, afinidad de unión aumentada por un ácido nucleico diana o resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*. Por ejemplo, dichos agentes pueden contener al menos una región modificada para conferir una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor captación celular, una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana o una mayor actividad inhibidora.

- 5 Una segunda región de tales agentes puede servir opcionalmente como sustrato para la endonucleasa celular RNasa H, que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN.

Un agente polinucleotídico antisentido ejemplar que tiene oligonucleótidos modificados dispuestos en patrones o motivos es un gapmer. En un "gapmer", una región interna o "espacio" que tiene una pluralidad de nucleótidos unidos que soporta la escisión de la RNasa H se coloca entre dos
10 regiones flanqueantes externas o "alas" que tienen una pluralidad de nucleótidos unidos que son químicamente distintos de los nucleótidos unidos del región interna. El segmento hueco generalmente sirve como sustrato para la escisión por endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleótidos modificados.

Las tres regiones de un motivo gapmer (el ala 5', el hueco, y el ala 3') forman una secuencia
15 contigua de nucleótidos y puede describirse como "XYZ", en la que "X" representa la longitud del motivo 5-ala, "Y" representa la longitud del espacio y "Z" representa la longitud del ala 3'. En una realización, un separador descrito como "XYZ" tiene una configuración tal que el segmento hueco se coloca inmediatamente adyacente a cada uno de los segmentos de ala 5' y 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el segmento del ala 5' y el segmento hueco, o el segmento del hueco y el
20 segmento del ala 3'. Cualquiera de los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede tener un motivo gapmer. En algunas realizaciones, X y Z son iguales, en otras realizaciones son diferentes.

En determinadas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de nucleótidos modificados en la región. Los tipos de nucleótidos modificados que pueden usarse para
25 diferenciar las regiones de un gapmer, en algunas realizaciones, incluyen β -D-ribonucleótidos, β -D-desoxirribonucleótidos, nucleótidos modificados en 2', por ejemplo, nucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, 2'-MOE y 2'-O—CH₃) y nucleótidos modificados con azúcares bicíclicos (por ejemplo, aquellos que tienen un puente 4'-(CH₂)_nO-2', donde n=1 o n=2).

En una realización, al menos algunos de los nucleótidos modificados de cada una de las alas
30 pueden diferir de al menos algunos de los nucleótidos modificados del hueco. Por ejemplo, al menos algunos de los nucleótidos modificados de cada ala que están más cerca del hueco (el nucleótido más en 3' del ala 5' y el nucleótido más en 5' del ala 3) difieren de los nucleótidos modificados de los nucleótidos del hueco vecinos, definiendo así el límite entre las alas y el hueco. En determinadas realizaciones, los nucleótidos modificados dentro del hueco son iguales entre sí. En determinadas
35 realizaciones, el hueco incluye uno o más nucleótidos modificados que difieren de los nucleótidos modificados de uno o más nucleótidos diferentes del hueco.

La longitud del ala 5' (X) de un gapmer puede tener una longitud de 1 a 6 nucleótidos, por ejemplo, de 2 a 6, de 2 a 5, de 3 a 6, de 3 a 5, de 1 a 5, de 1 a 4, 1 a 3, 2 a 4 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos de longitud.

La longitud del ala 3' (Z) de un gapmer puede tener una longitud de 1 a 6 nucleótidos, por ejemplo, de 2 a 6, de 2 a 5, de 3 a 6, de 3 a 5, de 1 a 5, de 1 a 4, 1 a 3, 2 a 4 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos de longitud.

La longitud del espacio (Y) de un gapmer puede tener una longitud de 5 a 14 nucleótidos, por ejemplo, de 5 a 13, de 5 a 12, de 5 a 11, de 5 a 10, de 5 a 9, de 5 a 8, de 5 a 7, 5 a 6, 6 a 14, 6 a 13, 6 a 12, 6 a 11, 6 a 10, 6 a 9, 6 a 8, 6 a 7, 7 a 14, 7 a 13, 7 a 12, 7 a 11, 7 a 10, 7 a 9, 7 a 8, 8 a 14, 8 a 13, 8 a 12, 8 a 11, 8 a 10, 8 a 9, 9 a 14, 9 a 13, 9 a 12, 9 a 11, 9 a 10, 10 a 14, 10 a 13, 10 a 12, 10 a 11, 11 a 14, 11 a 13, 11 a 12, 12 a 14, 12 a 13 o 13 a 14 nucleótidos en longitud, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones de la invención, X consta de 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos, Y consta de 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos y Z consta de 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos. Dichos gapmers incluyen (XYZ) 2-7-2, 2-7-3, 2-7-4, 2-7-5, 2-7-6, 3-7-2, 3-7-3, 3-7-4, 3-7-5, 3-7-6, 4-7-3, 4-7-4, 4-7-5, 4-7-6, 5-7-3, 5-7-4, 5-7-5, 5-7-6, 6-7-3, 6-7-4, 6-7-5, 6-7-6, 3-7-3, 3-7-4, 3-7-5, 3-7-6, 4-7-3, 4-7-4, 4-7-5, 4-7-6, 5-7-3, 5-7-4, 5-7-5, 5-7-6, 6-7-3, 6-7-4, 6-7-5, 6-7-6, 2-8-2, 2-8-3, 2-8-4, 2-8-5, 2-8-6, 3-8-2, 3-8-3, 3-8-4, 3-8-5, 3-8-6, 4-8-3, 4-8-4, 4-8-5, 4-8-6, 5-8-3, 5-8-4, 5-8-5, 5-8-6, 6-8-3, 6-8-4, 6-8-5, 6-8-6, 2-9-2, 2-9-3, 2-9-4, 2-9-5, 2-9-6, 3-9-2, 3-9-3, 3-9-4, 3-9-5, 3-9-6, 4-9-3, 4-9-4, 4-9-5, 4-9-6, 5-9-3, 5-9-4, 5-9-5, 5-9-6, 6-9-3, 6-9-4, 6-9-5, 6-9-6, 2-10-2, 2-10-3, 2-10-4, 2-10-5, 2-10-6, 3-10-2, 3-10-3, 3-10-4, 3-10-5, 3-10-6, 4-10-3, 4-10-4, 4-10-5, 4-10-6, 5-10-3, 5-10-4, 5-10-5, 5-10-6, 6-10-3, 6-10-4, 6-10-5, 6-10-6, 2-11-2, 2-11-3, 2-11-4, 2-11-5, 2-11-6, 3-11-2, 3-11-3, 3-11-4, 3-11-5, 3-11-6, 4-11-3, 4-11-4, 4-11-5, 4-11-6, 5-11-3, 5-11-4, 5-11-5, 5-11-6, 6-11-3, 6-11-4, 6-11-5, 6-11-6, 2-12-2, 2-12-3, 2-12-4, 2-12-5, 2-12-6, 3-12-2, 3-12-3, 3-12-4, 3-12-5, 3-12-6, 4-12-3, 4-12-4, 4-12-5, 4-12-6, 5-12-3, 5-12-4, 5-12-5, 5-12-6, 6-12-3, 6-12-4, 6-12-5 o 6-12-6.

En algunas realizaciones de la invención, los agentes polinucleotídicos antisentido dirigidos a INHBE incluyen un motivo gapmer 5-10-5. En otras realizaciones de la invención, los agentes polinucleotídicos antisentido dirigidos a INHBE incluyen un motivo gapmer 4-10-4. En otra realización de la invención, los agentes polinucleotídicos antisentido dirigidos a INHBE incluyen un motivo gapmer 3-10-3. Aún en otras realizaciones de la invención, los agentes polinucleotídicos antisentido dirigidos a INHBE incluyen un motivo gapmer 2-10-2.

El ala 5' o el ala 3' de un gapmer pueden incluir independientemente de 1 a 6 nucleótidos modificados, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos modificados.

En alguna realización, el ala 5' de un gapmer incluye al menos un nucleótido modificado. En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos dos nucleótidos modificados. En otra realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos tres nucleótidos modificados. En otra realización más, el ala 5' de un gapmer comprende al menos cuatro nucleótidos modificados. En otra realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos cinco nucleótidos modificados. En determinadas realizaciones, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un nucleótido modificado.

En algunas realizaciones, el ala 3' de un gapmer incluye al menos un nucleótido modificado. En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos dos nucleótidos modificados. En otra realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos tres nucleótidos modificados. En otra realización más, el ala 3' de un gapmer comprende al menos cuatro nucleótidos modificados. En otra

realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos cinco nucleótidos modificados. En determinadas realizaciones, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un nucleótido modificado.

En determinadas realizaciones, las regiones de un gapmer se diferencian por los tipos de restos de azúcar de los nucleótidos. En una realización, los nucleótidos de cada región distinta comprenden restos de azúcar uniformes. En otras realizaciones, los nucleótidos de cada región distinta comprenden diferentes restos de azúcar. En determinadas realizaciones, los motivos de modificación de nucleótidos de azúcar de las dos alas son iguales entre sí. En determinadas realizaciones, los motivos de modificación de nucleótidos de azúcar del ala 5' difieren del motivo de modificación de nucleótidos de azúcar del ala 3'.

El ala 5' de un gapmer puede incluir de 1 a 6 nucleótidos modificados, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos modificados.

En una realización, al menos un nucleótido modificado del ala 5' de un gapmer es un nucleótido bicíclico, tal como un etilnucleótido restringido o un LNA. En otra realización, el ala 5' de un gapmer incluye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos bicíclicos. En algunas realizaciones, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un nucleótido bicíclico.

En una realización, el ala 5' de un gapmer incluye al menos 1, 2, 3, 4 o 5 etilnucleótidos restringidos. En algunas realizaciones, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un etilnucleótido restringido.

En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos un nucleótido de LNA. En otra realización, el ala 5' de un gapmer incluye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de LNA. En otras realizaciones, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un nucleótido de LNA.

En determinadas realizaciones, al menos un nucleótido modificado del ala 5' de un gapmer es un nucleótido modificado no bicíclico, por ejemplo, un nucleótido sustituido en 2'. Un “nucleótido sustituido en 2'” es un nucleótido que comprende una modificación en la posición 2' que es distinta de H u OH, tal como un nucleótido 2'-OMe o un nucleótido 2'-MOE. En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende 2, 3, 4 o 5 nucleótidos sustituidos en 2'. En una realización, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un nucleótido sustituido en 2'.

En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos un nucleótido 2'-OMe. En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos 2'-OMe. En una realización, cada uno de los nucleótidos del ala 5' de un gapmer comprende un nucleótido 2'-OMe.

En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos un nucleótido 2'-MOE. En una realización, el ala 5' de un gapmer comprende al menos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos 2'-MOE. En una realización, cada uno de los nucleótidos del ala 5' de un gapmer comprende un nucleótido 2'-MOE.

En determinadas realizaciones, el ala 5' de un gapmer comprende al menos un 2'-desoxinucleótido. En determinadas realizaciones, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un 2'-desoxinucleótido. En determinadas realizaciones, el ala 5' de un gapmer comprende al menos un ribonucleótido. En determinadas realizaciones, cada nucleótido del ala 5' de un gapmer es un ribonucleótido.

El ala 3' de un gapmer puede incluir de 1 a 6 nucleótidos modificados, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos modificados.

En una realización, al menos un nucleótido modificado del ala 3' de un gapmer es un nucleótido bicíclico, tal como un etilnucleótido restringido o un LNA. En otra realización, el ala 3' de un gapmer incluye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos bicíclicos. En algunas realizaciones, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un nucleótido bicíclico.

En una realización, el ala 3' de un gapmer incluye al menos un etilnucleótido restringido. En otra realización, el ala 3' de un gapmer incluye 2, 3, 4 o 5 etilnucleótidos restringidos. En algunas realizaciones, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un nucleótido de etilo restringido.

En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos un nucleótido de LNA. En otra realización, el ala 3' de un gapmer incluye 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de LNA. En otras realizaciones, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un nucleótido de LNA.

En determinadas realizaciones, al menos un nucleótido modificado del ala 3' de un gapmer es un nucleótido modificado no bicíclico, por ejemplo, un nucleótido sustituido en 2'. En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende 2, 3, 4 o 5 nucleótidos sustituidos en 2'. En una realización, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un nucleótido sustituido en 2'.

En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos un nucleótido 2'-OMe. En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos 2'-OMe. En una realización, cada uno de los nucleótidos del ala 3' de un gapmer comprende un nucleótido 2'-OMe.

En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos un nucleótido 2'-MOE. En una realización, el ala 3' de un gapmer comprende al menos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos 2'-MOE. En una realización, cada uno de los nucleótidos del ala 3' de un gapmer comprende un nucleótido 2'-MOE.

En determinadas realizaciones, el ala 3' de un gapmer comprende al menos un 2'-desoxinucleótido. En determinadas realizaciones, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un 2'-desoxinucleótido. En determinadas realizaciones, el ala 3' de un gapmer comprende al menos un ribonucleótido. En determinadas realizaciones, cada nucleótido del ala 3' de un gapmer es un ribonucleótido.

El hueco de un gapmer puede incluir de 5 a 14 nucleótidos modificados, por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos modificados.

En una realización, el hueco de un gapmer comprende al menos una 5-metilcitosina. En una realización, el hueco de un gapmer comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 5-metilcitosinas. En una realización, todos los nucleótidos del hueco de un gapmer son 5-metilcitosinas.

En una realización, el hueco de un gapmer comprende al menos un 2'-desoxinucleótido. En una realización, el hueco de un gapmer comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 2'-desoxinucleótidos. En una realización, todos los nucleótidos del hueco de un gapmer son 2'-desoxinucleótidos.

Un gapmer puede incluir uno o más enlaces internucleotídicos modificados. En algunas realizaciones, un gapmer incluye uno o más enlaces internucleotídicos fosfodiéster. En otras realizaciones, un gapmer incluye uno o más enlaces internucleotídicos fosforotioato.

En una realización, cada nucleótido de un ala 5' de un gapmer está unido mediante un enlace internucleótido fosforotioato. En otra realización, cada nucleótido de un ala 3' de un gapmer está unido mediante un enlace internucleótido fosforotioato. En otra realización más, cada nucleótido de

un segmento hueco de un gapmer está unido mediante un enlace internucleotídico fosforotioato. En una realización, todos los nucleótidos en un gapmer están unidos mediante enlaces internucleotídicos de fosforotioato.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
5 comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cinco nucleótidos y un segmento de ala 3'
que comprende 5 nucleótidos.

En otra realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
10 adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cuatro nucleótidos y un segmento de ala 3'
que comprende cuatro nucleótidos.

En otra realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende tres nucleótidos y un segmento de ala 3'
15 que comprende tres nucleótidos.

En otra realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende dos nucleótidos y un segmento de ala 3'
que comprende dos nucleótidos.

En una realización, cada nucleótido de 5 alas que flanquea un segmento hueco de 10 2'-
desoxirribonucleótidos comprende un nucleótido modificado. En otra realización, cada nucleótido de
un ala 3 que flanquea un segmento hueco de 10 2'-desoxirribonucleótidos comprende un nucleótido
modificado. En una realización, cada uno de los nucleótidos del ala 5' modificados y cada uno de los
nucleótidos del ala 3' modificados comprenden una modificación del azúcar 2'. En una realización, la
25 modificación de 2'-azúcar es una modificación de 2'-OMe. En otra realización, la modificación de 2'-
azúcar es una modificación de 2'-MOE. En una realización, cada uno de los nucleótidos del ala 5'
modificados y cada uno de los nucleótidos del ala 3' modificados comprenden un nucleótido bicíclico.
En una realización, el nucleótido bicíclico es un nucleótido de etilo restringido. En otra realización, el
nucleótido bicíclico es un nucleótido LNA. En una realización, cada citosina en un agente
30 polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cinco nucleótidos que comprenden una
modificación de 2'OMe y un segmento de ala 3' que comprende cinco nucleótidos que comprenden
35 una modificación 2'OMe, en el que cada enlace entre nucleótidos del agente es un enlace
fosforotioato. En una realización, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina. En algunas
realizaciones, el agente comprende además un ligando.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
40 adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cinco nucleótidos que comprenden una

modificación de 2'MOE y un segmento de ala 3' que comprende cinco nucleótidos que comprenden una modificación 2'MOE, en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En una realización, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina. En algunas realizaciones, el agente comprende además un ligando.

5 En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cinco nucleótidos de etilo restringidos y un segmento de ala 3' que comprende cinco nucleótidos de etilo restringidos. nucleótidos, en donde cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina
10 del agente es una 5-metilcitosina.

 En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cinco nucleótidos de LNA y un segmento de ala 3' que comprende cinco nucleótidos de LNA, en el que cada enlace internucleotídico del agente
15 es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

 En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cuatro nucleótidos que comprenden una modificación de 2'OMe y un segmento de ala 3' que comprende cuatro nucleótidos que comprenden
20 una modificación 2'OMe, en el que cada enlace entre nucleótidos del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

 En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cuatro nucleótidos que comprenden una
25 modificación de 2'MOE y un segmento de ala 3' que comprende cuatro nucleótidos que comprenden una modificación 2'MOE, en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

 En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cuatro nucleótidos de etilo restringidos y
30 un segmento de ala 3' que comprende cuatro nucleótidos de etilo restringidos. nucleótidos, en donde cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

 En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE
35 comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende cuatro nucleótidos de LNA y un segmento de ala 3' que comprende cuatro nucleótidos de LNA. en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende tres nucleótidos que comprenden una modificación de 2'OMe y un segmento de ala 3' que comprende tres nucleótidos que comprenden una modificación 2'OMe, en el que cada enlace entre nucleótidos del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende tres nucleótidos que comprenden una modificación de 2'MOE y un segmento de ala 3' que comprende tres nucleótidos que comprenden una modificación 2'MOE, en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende tres nucleótidos de etilo restringidos y un segmento de ala 3' que comprende tres nucleótidos de etilo restringidos. nucleótidos, en donde cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende tres nucleótidos de LNA y un segmento de ala 3' que comprende tres nucleótidos de LNA. en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende dos nucleótidos que comprenden una modificación 2'OMe y un segmento de ala 3' que comprende dos nucleótidos que comprenden una modificación 2'OMe, en el que cada enlace entre nucleótidos del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende dos nucleótidos que comprenden una modificación de 2'MOE y un segmento de ala 3' que comprende dos nucleótidos que comprenden una modificación 2'MOE, en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende dos nucleótidos de etilo restringidos y un segmento de ala 3' que comprende dos nucleótidos de etilo restringidos. nucleótidos, en donde cada

enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

En una realización, un agente polinucleotídico antisentido dirigido a un gen INHBE comprende un segmento hueco de diez 2'-desoxirribonucleótidos colocados inmediatamente
5 adyacentes a y entre un segmento de ala 5' que comprende dos nucleótidos de LNA y un segmento de ala 3' que comprende dos nucleótidos de LNA. en el que cada enlace internucleotídico del agente es un enlace fosforotioato. En algunas realizaciones, cada citosina del agente es una 5-metilcitosina.

Otros diseños de gapmer adecuados para su uso en los agentes, composiciones y métodos de la invención se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses números 7.687.617 y
10 8.580.756; Publicaciones de patentes de EE. UU. Nos. 20060128646, 20090209748, 20140128586, 20140128591, 20100210712 y 20080015162A1; y la Publicación Internacional No. WO 2013/159108, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

15 **vi. Moduladores conjugados con ligandos**

Otra modificación de los moduladores, por ejemplo, oligonucleótidos, por ejemplo, agentes de ARNbc, agentes de polinucleótidos antisentido, ARN guía que efectúan la edición de ADAR o ARN guía que efectúan la edición de CRISPR, de la invención implica unir químicamente el modulador a uno o más ligandos, restos o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o
20 absorción celular del oligonucleótido, por ejemplo, en una célula. Dichos restos incluyen, entre otros, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). En otras realizaciones, el ligando es ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), un tioéter, *por ejemplo*, beril-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), un
25 tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), una cadena alifática, *por ejemplo*, dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), un fosfolípido, *por ejemplo*, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac -glicero-3-fosfonato (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*,
30 1990, 18:3777-3783), una poliamina o un polietilenglicol. cadena (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), un resto palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biofísica. Acta*, 1995, 1264:229-237), o un resto de octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

En determinadas realizaciones, un ligando altera la distribución, el direccionamiento o la vida útil de un oligonucleótido al que se incorpora. En algunas realizaciones, un ligando proporciona una afinidad mejorada por una diana seleccionada, *por ejemplo*, molécula, célula o tipo de célula, compartimento, *por ejemplo*, un compartimento celular u orgánico, tejido, órgano o región del cuerpo, como, *por ejemplo*, en comparación con una especie. en ausencia de dicho ligando. En algunas
40 realizaciones, los ligandos no participan en el emparejamiento dúplex en un ácido nucleico dúplex.

Los ligandos pueden incluir una sustancia natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); carbohidrato (por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen poliaminoácido que es una polilisina (PLL), -ácido poli L aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolizado), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa-helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos diana, por ejemplo, un agente dirigido a células o tejidos, por ejemplo, una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico tal como una célula de riñón. Un grupo diana puede ser una tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioactiva A, mucina carbohidrato, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina o un péptido RGD o mimético de péptido RGD. En determinadas realizaciones, el ligando es una galactosa multivalente, por ejemplo, una N-acetil-galactosamina.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercalantes (p. ej., acridinas), reticulantes (p. ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p. ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p. ej., EDTA), moléculas lipófilas, *por ejemplo*, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados de péptidos (p. ej., péptido de antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino., mercapto, PEG (p. ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (p. ej., biotina), facilitadores de transporte/absorción (p. ej., aspirina, vitamina E, fólico ácido), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, grupos de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula específico tal como una célula hepática. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores hormonales. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente,

galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina manosa multivalente o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la MAP quinasa p38 o un activador de NF- κ B.

El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, un fármaco, que puede aumentar la absorción del modulador, por ejemplo, oligonucleótido, por ejemplo, agente de ARNbc o agente polinucleótido antisentido, en la célula, por ejemplo, alterando el citoesqueleto de la célula, por ejemplo, mediante alterar los microtúbulos, microfilamentos o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxol, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholide A, indanocina o mioservina.

En algunas realizaciones, un ligando unido a un oligonucleótido como se describe en el presente documento actúa como un modulador farmacocinético (modulador de PK). Los moduladores de PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes aglutinantes de proteínas, PEG, vitaminas, *etc.* Los moduladores de PK ejemplares incluyen, entre otros, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina. También se sabe que los oligonucleótidos que comprenden varios enlaces fosforotioato se unen a la proteína sérica, por lo que los oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples enlaces fosforotioato en la columna vertebral también son susceptibles a la presente invención como ligandos (por ejemplo, como ligandos moduladores de PK). Además, los aptámeros que se unen a componentes séricos (por ejemplo, proteínas séricas) también son adecuados para su uso como ligandos moduladores de PK en las realizaciones descritas en el presente documento.

Los oligonucleótidos conjugados con ligando de la invención se pueden sintetizar mediante el uso de un oligonucleótido que porta una funcionalidad reactiva colgante, tal como la derivada de la unión de una molécula de enlace al oligonucleótido (descrita a continuación). Este oligonucleótido reactivo puede hacerse reaccionar directamente con ligandos disponibles comercialmente, ligandos que se sintetizan con cualquiera de una variedad de grupos protectores o ligandos que tienen un resto de enlace unido a ellos.

Los oligonucleótidos usados en los conjugados de la presente invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Varios proveedores venden equipos para dicha síntesis, incluido, por ejemplo, Applied Biosystems® (Foster City, California). Se puede emplear adicional o alternativamente cualquier otro método para dicha síntesis conocido en la técnica. También se sabe utilizar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

En los oligonucleótidos conjugados con ligando y ligando-molécula que porta nucleósidos unidos de secuencia específica de la presente invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos pueden ensamblarse en un sintetizador de ADN adecuado utilizando precursores de nucleótidos o nucleósidos estándar, o precursores de nucleótidos o conjugados de nucleósidos que ya llevan el resto de enlace, precursores de conjugado de ligando-nucleótido o nucleósido que ya llevan la molécula de ligando, o bloques de construcción que no llevan ligando de nucleósido.

Cuando se utilizan precursores de conjugados de nucleótidos que ya llevan un resto de enlace, la síntesis de los nucleósidos unidos de secuencia específica normalmente se completa y luego la molécula de ligando reacciona con el resto de enlace para formar el oligonucleótido conjugado de ligando. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos o nucleósidos unidos de la presente invención se sintetizan mediante un sintetizador automatizado usando fosforamiditas derivadas de conjugados ligando-nucleósido además de las fosforamiditas estándar y las fosforamiditas no estándar que están disponibles comercialmente y se usan de manera rutinaria en la síntesis de oligonucleótidos.

A. Conjugados lipídicos

En determinadas realizaciones, el ligando o conjugado es un lípido o una molécula basada en lípidos. En una realización, dicho lípido o molécula basada en lípidos se une a una proteína sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana, por ejemplo, un tejido diana del cuerpo no renal. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluidas las células parenquimatosas del hígado. También se pueden utilizar como ligandos otras moléculas que pueden unirse a HSA. Por ejemplo, se pueden utilizar naproxeno o aspirina. Un lípido o un ligando basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte dentro de una célula o membrana celular diana, o (c) puede usarse para ajustar la unión a una proteína sérica, por ejemplo, HSA.

Puede usarse un ligando basado en lípidos para inhibir, por ejemplo, controlar la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un lípido o un ligando basado en lípidos que se une más fuertemente a HSA tendrá menos probabilidades de dirigirse al riñón y, por lo tanto, será menos probable que se elimine del cuerpo. Se puede utilizar un lípido o un ligando basado en lípidos que se una a HSA con menos fuerza para dirigir el conjugado al riñón.

En determinadas realizaciones, el ligando basado en lípidos se une a HSA. En una realización, se une a HSA con una afinidad suficiente para que el conjugado se distribuya a un tejido no renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la unión del ligando HSA no pueda revertirse.

En otras realizaciones, el ligando basado en lípidos se une débilmente a HSA o no se une en absoluto. En una realización, el conjugado se distribuirá al riñón. También se pueden usar otros restos que se dirigen a células renales en lugar de, o además del ligando basado en lípidos.

En otro aspecto, el ligando es un resto, por ejemplo, una vitamina, que es absorbido por una célula diana, por ejemplo, una célula en proliferación. Éstos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada, por ejemplo, de tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. Las vitaminas ejemplares incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas ejemplares incluyen vitamina B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células diana tales como las células hepáticas. También se incluyen HSA y lipoproteínas de baja densidad (LDL).

B. Agentes de permeación celular

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, tal como un agente de permeación celular helicoidal. En una realización, el agente es anfipático. Un agente ejemplar es un péptido tal como tat o antennopepida. Si el agente es un péptido, se puede modificar, incluyendo un peptidomimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos y el uso de D-aminoácidos.

5 En una realización, el agente helicoidal es un agente alfa-helicoidal, que tiene una fase lipófila y otra lipofóbica.

El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en el presente documento oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. La unión de péptidos y
10 peptidomiméticos a agentes de ARNi puede afectar la distribución farmacocinética del ARNi, por ejemplo mejorando el reconocimiento y la absorción celular. El péptido o resto peptidomimético puede tener una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 aminoácidos de longitud.

Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, un
15 péptido catiónico, un péptido anfipático o un péptido hidrofóbico (por ejemplo, que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímero, un péptido restringido o un péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS). Un péptido hidrófobo que contiene MTS a modo de ejemplo es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 14).
20 Un análogo de RFGF (p. ej., secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO :15) que contiene un MTS hidrófobo también puede ser un resto de direccionamiento. El resto peptídico puede ser un péptido de "administración", que puede transportar grandes moléculas polares que incluyen péptidos, oligonucleótidos, Por ejemplo, se ha descubierto que las secuencias de la proteína Tat del VIH (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO:16) y la proteína Antennapedia de Drosophila
25 (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:17) son capaces de funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede codificarse mediante una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de presentación en fagos o una biblioteca combinatoria de una perla, un compuesto (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82 -84, 1991). Ejemplos de un péptido o peptidomimético unido a un agente de ARNbc mediante una unidad
30 monomérica incorporada con fines de direccionamiento celular es un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), o un imitador de RGD, longitud desde aproximadamente 5 aminoácidos hasta aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o dirigir propiedades conformacionales. Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales que se describen a continuación.

35 Un péptido RGD para uso en las composiciones y métodos de la invención puede ser lineal o cíclico y puede modificarse, por ejemplo, glicosilado o metilado, para facilitar el direccionamiento a un tejido específico. Los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden incluir D-aminoácidos, así como imitadores sintéticos de RGD. Además de RGD, se pueden utilizar otros restos que se dirijan al ligando de integrina, por ejemplo, PECAM-1 o VEGF.

Un "péptido de permeación celular" es capaz de permear una célula, por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido que permea las células microbianas puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Ceropin P1), un péptido que contiene enlaces disulfuro (por ejemplo, α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un péptido que contiene sólo uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que se deriva del dominio peptídico de fusión de gp41 del VIH-1 y el NLS del antígeno T grande de SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

C. Conjugados de carbohidratos

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos de la invención, un oligonucleótido, por ejemplo, un agente de ARNbc o un agente de polinucleótido antisentido, comprende además un carbohidrato. El oligonucleótido conjugado con carbohidratos es ventajoso para la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, así como composiciones adecuadas para uso terapéutico *in vivo*, como se describe en el presente documento. Como se usa en el presente documento, "carbohidrato" se refiere a un compuesto que es un carbohidrato *per se* formado por una o más unidades de monosacárido que tienen al menos 6 átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos) con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono; o un compuesto que tiene como parte del mismo un resto de carbohidrato formado por una o más unidades de monosacárido, cada una de las cuales tiene al menos seis átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos), con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono. Los carbohidratos representativos incluyen los azúcares (mono, di, tri y oligosacáridos que contienen aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 unidades de monosacáridos) y polisacáridos tales como almidones, glucógeno, celulosa y gomas de polisacáridos. Los monosacáridos específicos incluyen azúcares C5 y superiores (por ejemplo, C5, C6, C7 o C8); Los di- y trisacáridos incluyen azúcares que tienen dos o tres unidades de monosacáridos (por ejemplo, C5, C6, C7 o C8).

En determinadas realizaciones, un conjugado de carbohidrato para uso en las composiciones y métodos de la invención es un monosacárido.

En determinadas realizaciones, el monosacárido es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). Los conjugados de GalNAc, que comprenden uno o más derivados de N-acetilgalactosamina (GalNAc), se describen, por ejemplo, en el documento US 8.106.022, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia. En algunas realizaciones, el conjugado GalNAc sirve como ligando que dirige el ARNi a células particulares. En algunas realizaciones, el conjugado GalNAc dirige el ARNi a las células hepáticas, por ejemplo, sirviendo como ligando para el receptor de asialoglicoproteína de las células hepáticas (por ejemplo, hepatocitos).

En algunas realizaciones, el conjugado de carbohidratos comprende uno o más derivados de GalNAc. Los derivados de GalNAc pueden unirse mediante un enlace, por ejemplo, un enlace ramificado bivalente o trivalente. En algunas realizaciones, el conjugado GalNAc se conjuga con el

extremo 3' de la cadena sentido. En algunas realizaciones, el conjugado de GalNAc se conjuga con el agente oligonucleotídico (por ejemplo, con el extremo 3' de la cadena sentido) mediante un enlace, por ejemplo, un enlace como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el conjugado GalNAc se conjuga con el extremo 5' de la cadena sentido. En algunas realizaciones, el conjugado de GalNAc se conjuga con el agente de ARNi (por ejemplo, con el extremo 5' de la cadena sentido) mediante un enlace, por ejemplo, un enlace como se describe en el presente documento.

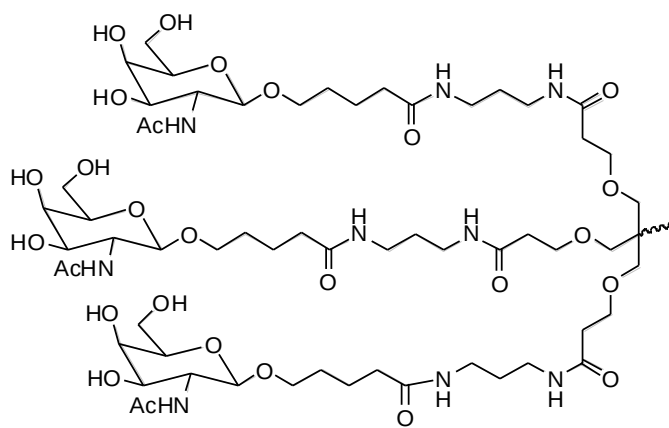
En determinadas realizaciones de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace monovalente. En algunas realizaciones, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace bivalente. En otras realizaciones más de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace trivalente. En otras realizaciones de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace tetravalente.

En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención comprenden una GalNAc o un derivado de GalNAc unido al oligonucleótido. En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos de la invención comprenden una pluralidad (p. ej., 2, 3, 4, 5 o 6) GalNAc o derivados de GalNAc, cada uno unido independientemente a una pluralidad de nucleótidos del oligonucleótido a través de una pluralidad de enlaces monovalentes.

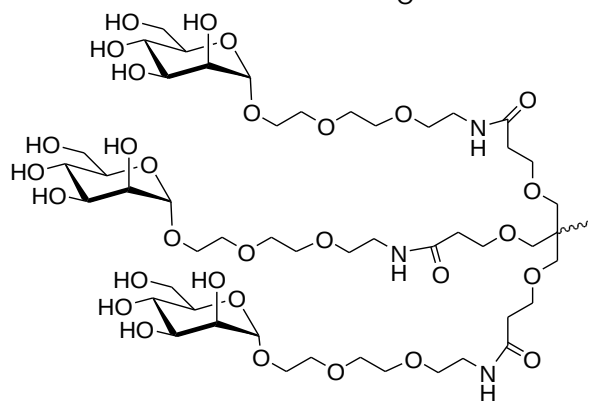
En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando las dos cadenas de un agente de ARNi de la invención son parte de una molécula más grande conectada por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra respectiva. cadena que forma un bucle en horquilla que comprende una pluralidad de nucleótidos desapareados, cada nucleótido desapareado dentro del bucle en horquilla puede comprender independientemente una GalNAc o un derivado de GalNAc unido mediante un enlace monovalente. El bucle de horquilla también puede estar formado por un saliente extendido en una cadena del dúplex.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando las dos cadenas de un agente de ARNi de la invención son parte de una molécula más grande conectada por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra respectiva. cadena que forma un bucle en horquilla que comprende una pluralidad de nucleótidos desapareados, cada nucleótido desapareado dentro del bucle en horquilla puede comprender independientemente una GalNAc o un derivado de GalNAc unido mediante un enlace monovalente. El bucle de horquilla también puede estar formado por un saliente extendido en una cadena del dúplex.

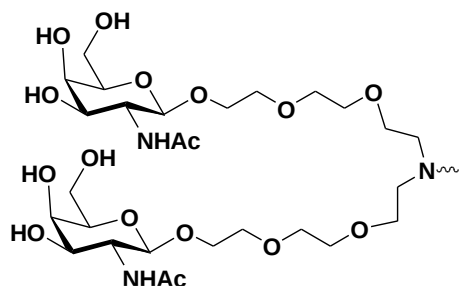
En una realización, un conjugado de carbohidrato para uso en las composiciones y métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



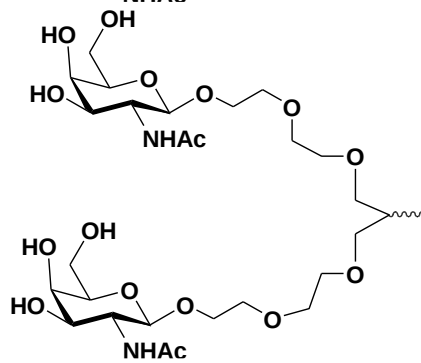
Fórmula II,



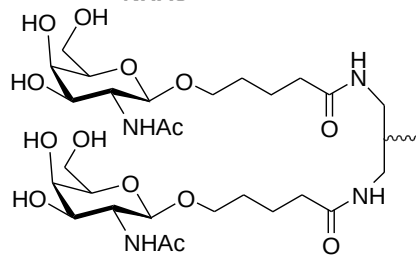
Fórmula III,



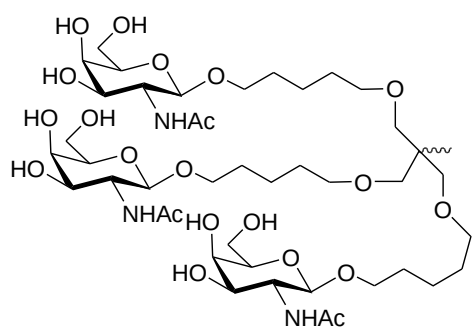
Fórmula IV,



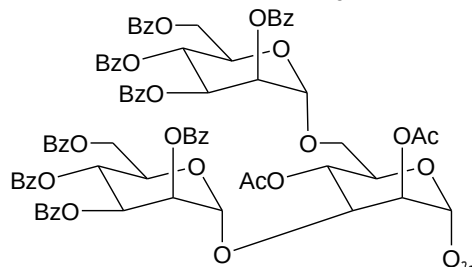
Fórmula V,



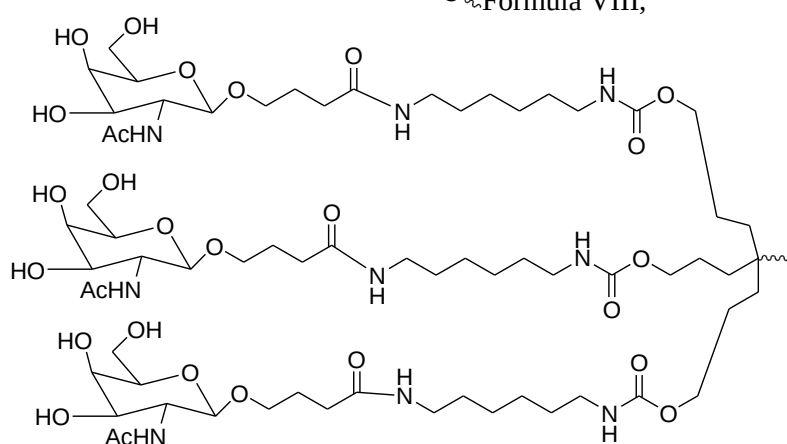
Fórmula VI,



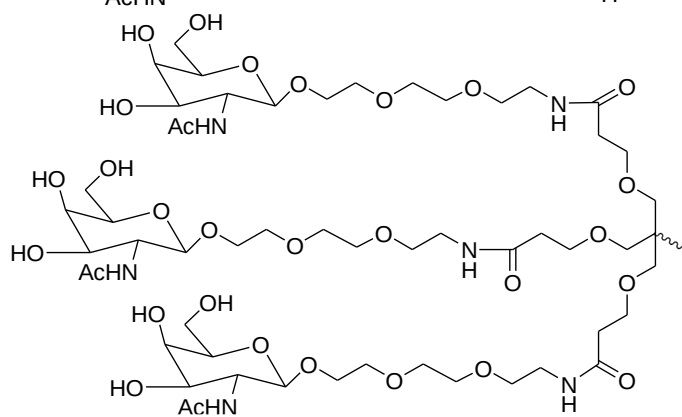
Fórmula VII,



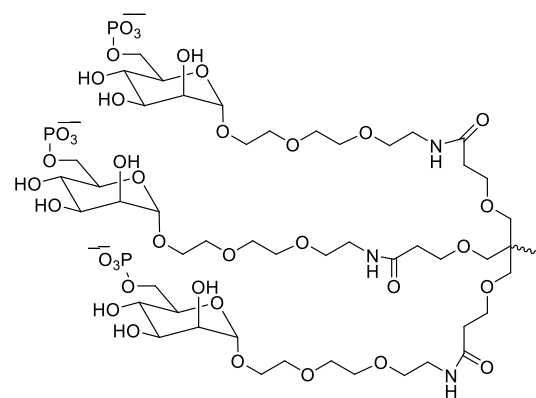
Fórmula VIII,



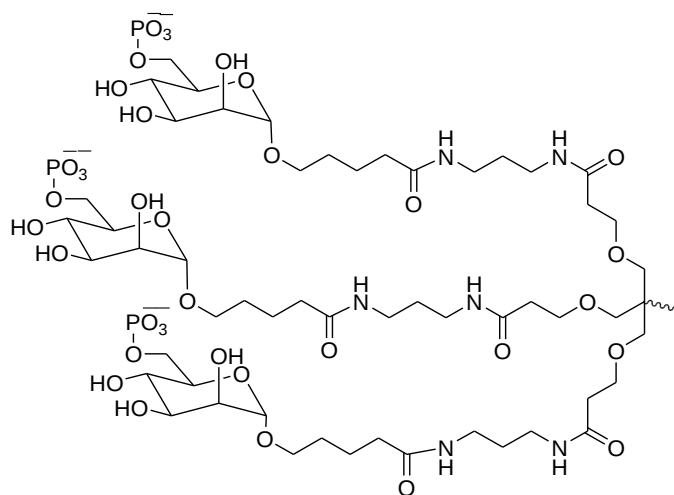
Fórmula IX,



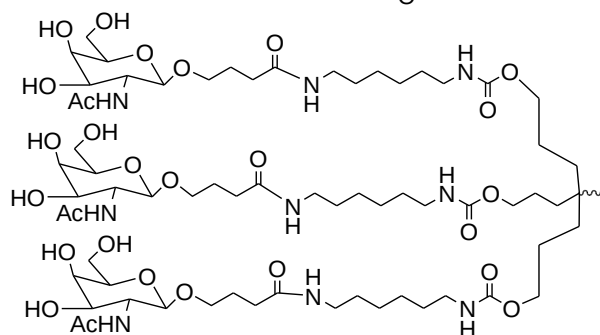
Fórmula X,



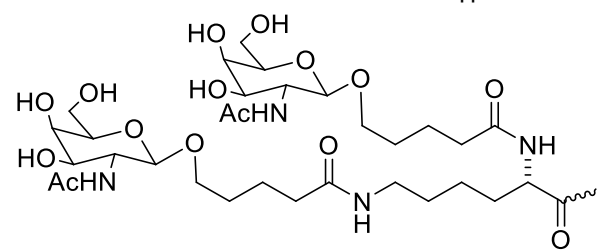
Fórmula XI,



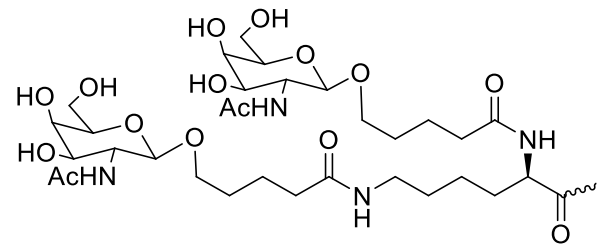
Fórmula XII,



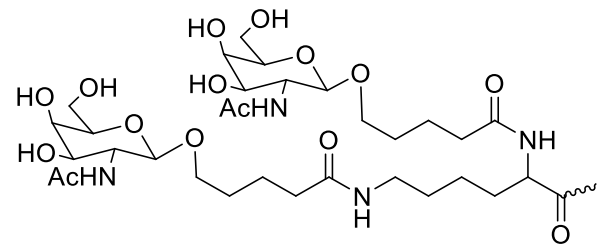
Fórmula XIII,



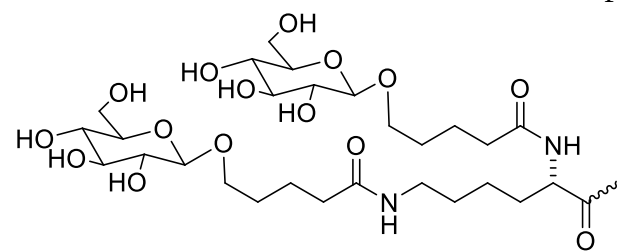
Fórmula XIV,



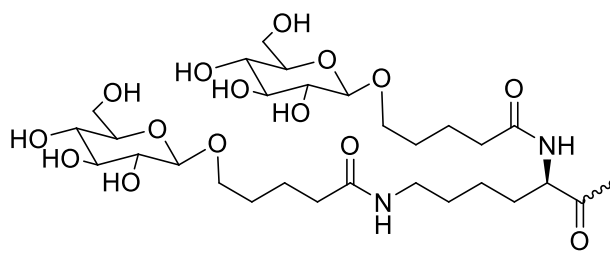
Fórmula XV,



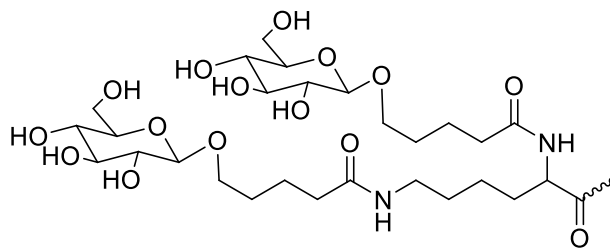
Fórmula XVI,



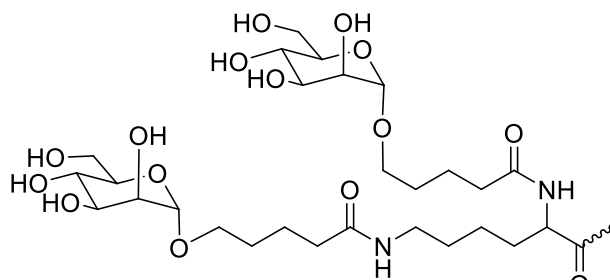
Fórmula XVII,



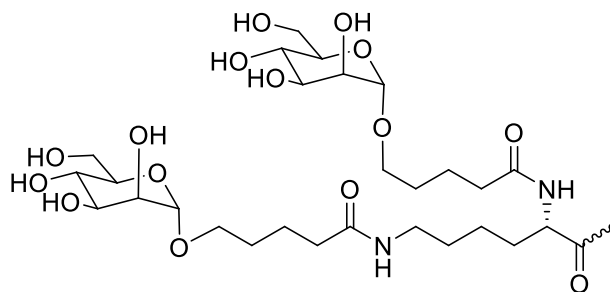
Fórmula XVIII,



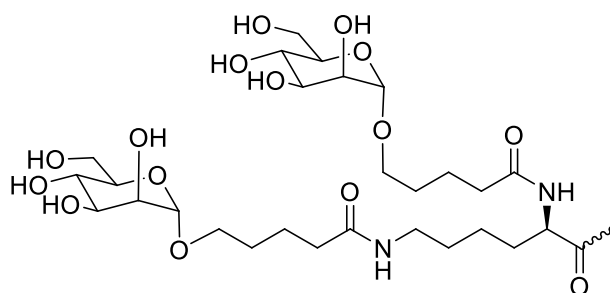
Fórmula XIX,



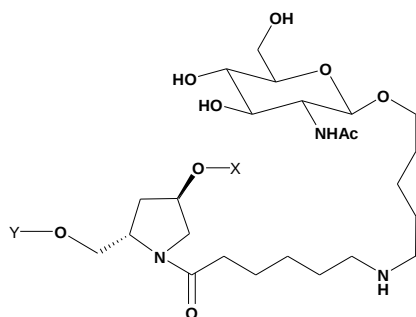
Fórmula XX,



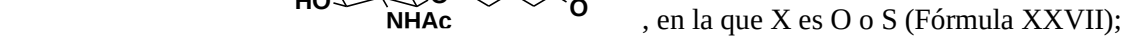
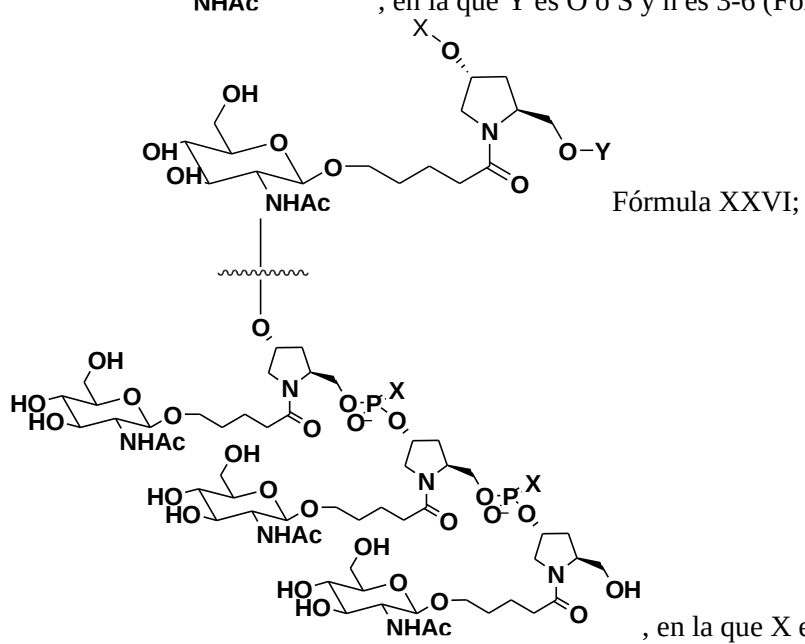
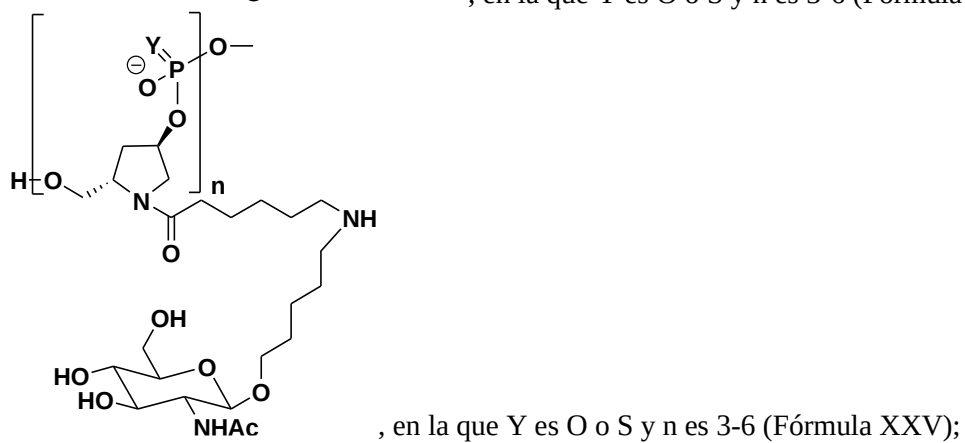
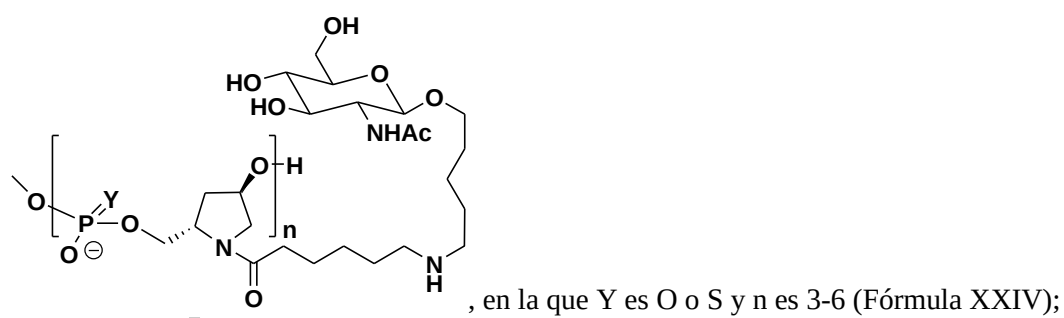
Fórmula XXI,

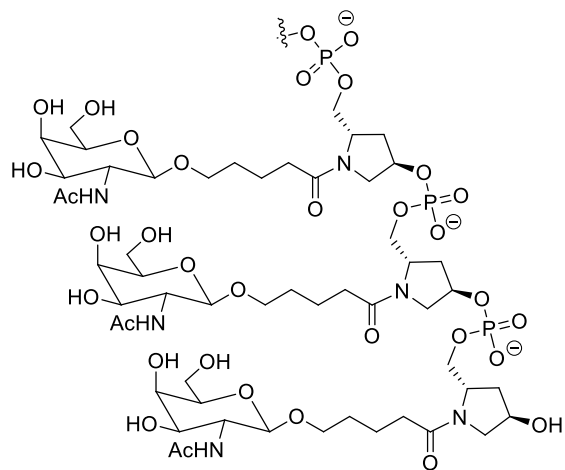
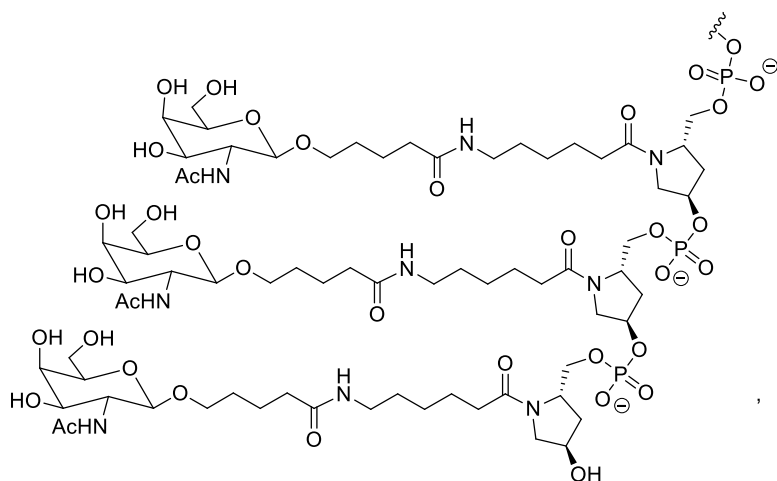


Fórmula XXII,

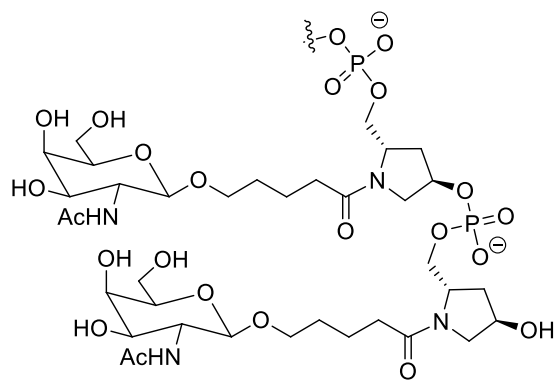
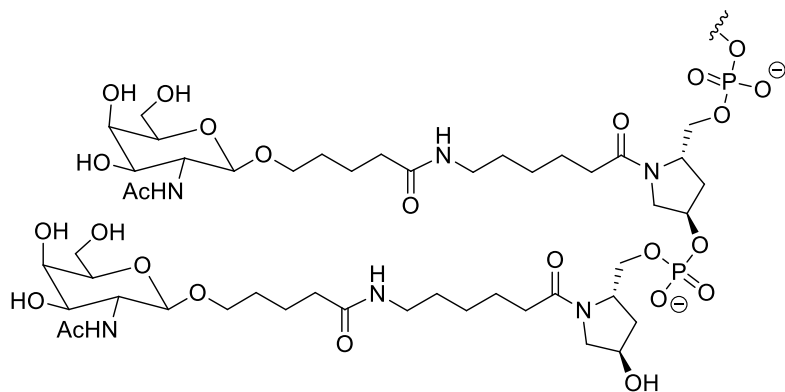


Fórmula XXIII;



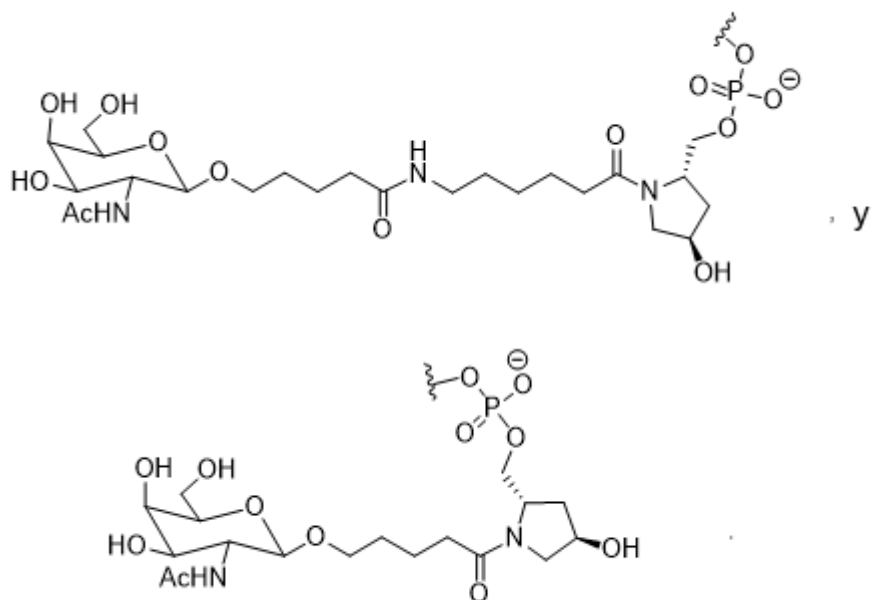


Fórmula XXVII; Fórmula XXIX;



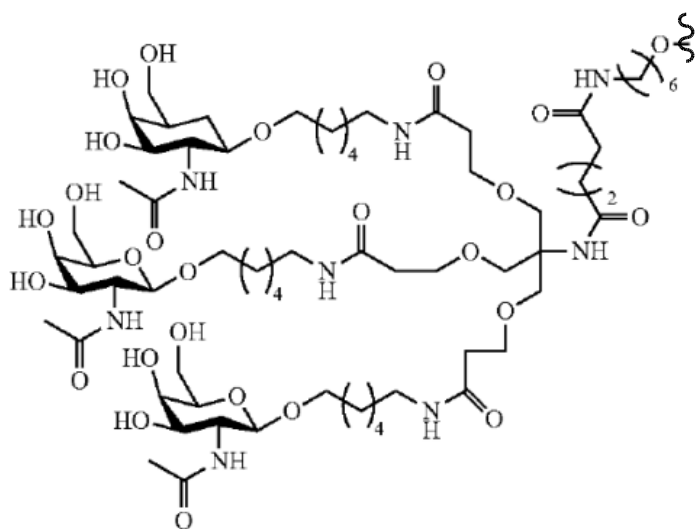
Fórmula XXX;

Fórmula XXXI;



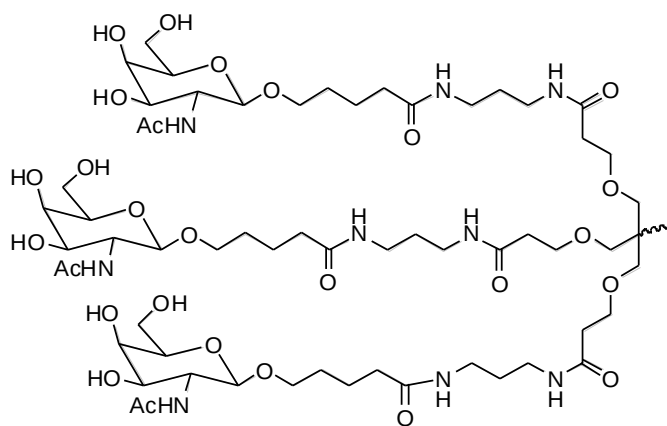
Fórmula XXXII;

Fórmula XXXIII.



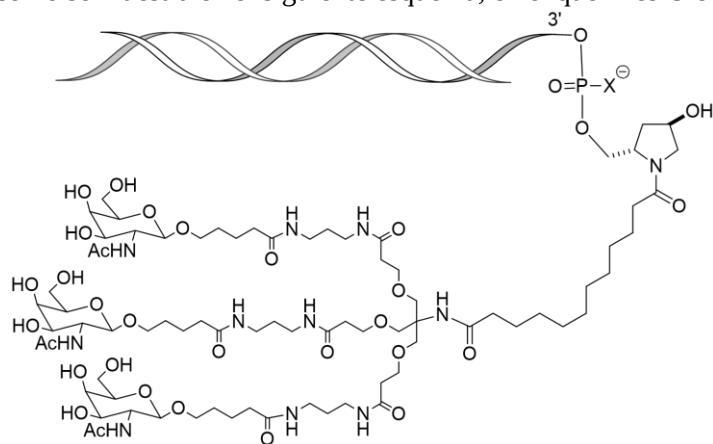
Fórmula XXXIV.

- 5 En otra realización, un conjugado de carbohidrato para uso en las composiciones y métodos de la invención es un monosacárido. En una realización, el monosacárido es una N-acetilgalactosamina, tal como

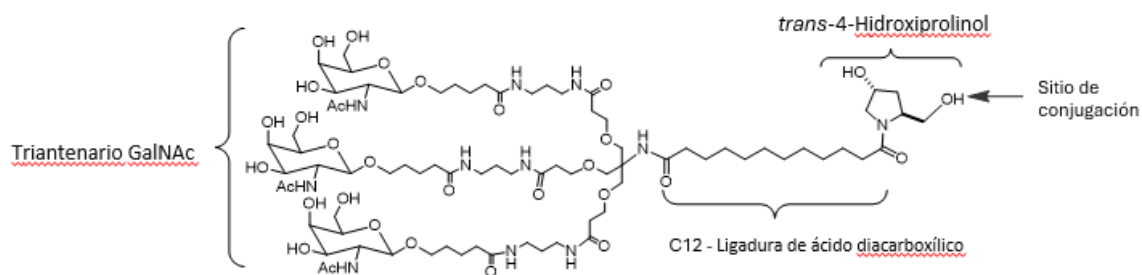


Fórmula II.

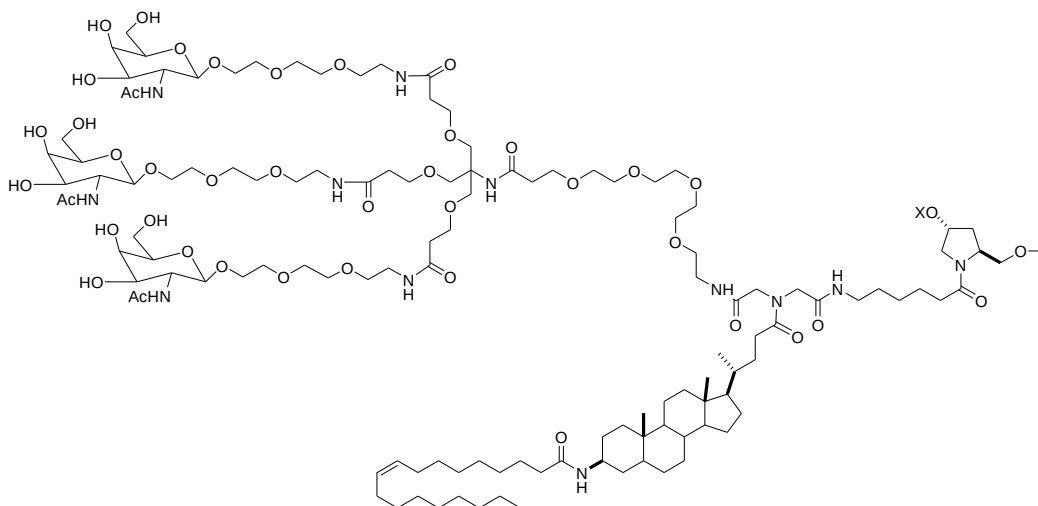
En algunas realizaciones, el oligonucleótido se une al conjugado de carbohidrato *mediante* un enlace como se muestra en el siguiente esquema, en el que X es O o S.



- 5 En algunas realizaciones, el oligonucleótido se conjuga con L96 como se define en la Tabla 1 y se muestra a continuación:

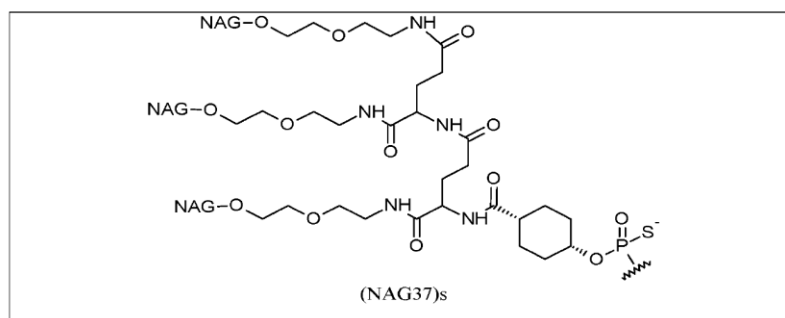


Otro conjugado de carbohidratos representativo para usar en las realizaciones descritas en el presente documento incluye, entre otros,



(Fórmula XXXVI), cuando uno de X o Y es un oligonucleótido, el otro es un hidrógeno.

En algunas realizaciones, un ligando adecuado es un ligando divulgado en el documento WO 2019/055633, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia. En una realización, el ligando comprende la siguiente estructura:



En determinadas realizaciones de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace monovalente. En algunas realizaciones, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace bivalente. En otras realizaciones más de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc se une a un oligonucleótido de la invención mediante un enlace trivalente.

En una realización, los oligonucleótidos de la invención comprenden uno o más GalNAc o derivado de GalNAc unidos al oligonucleótido. La GalNAc puede unirse a cualquier nucleótido mediante un enlace en la cadena sentido o cadena antisentido. El GalNAc puede estar unido al extremo 5' de la cadena sentido, al extremo 3' de la cadena sentido, al extremo 5' de la cadena antisentido o al extremo 3' de la cadena antisentido. En una realización, la GalNAc está unida al extremo 3' de la cadena sentido, por ejemplo, a través de un enlace trivalente.

En otras realizaciones, los oligonucleótidos de la invención comprenden una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) GalNAc o derivados de GalNAc, cada uno unido independientemente a una

pluralidad de nucleótidos del oligonucleótido a través de una pluralidad de enlaces, por ejemplo, enlaces monovalentes.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando las dos cadenas de un agente de ARNi de la invención son parte de una molécula más grande conectada por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra respectiva. cadena que forma un bucle en horquilla que comprende una pluralidad de nucleótidos desapareados, cada nucleótido desapareado dentro del bucle en horquilla puede comprender independientemente una GalNAc o un derivado de GalNAc unido mediante un enlace monovalente.

En algunas realizaciones, el conjugado de carbohidratos comprende además uno o más ligandos adicionales como se describió anteriormente, tales como, entre otros, un modulador de PK o un péptido de permeación celular.

Los conjugados y enlaces de carbohidratos adicionales adecuados para su uso en la presente invención incluyen los descritos en las publicaciones PCT números WO 2014/179620 y WO 2014/179627, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

D. Enlaces

En algunas realizaciones, el conjugado o ligando descrito en el presente documento se puede unir a un oligonucleótido con diversos enlaces que pueden ser escindibles o no escindibles.

El término "enlace" o "grupo enlace" significa un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto, por ejemplo, une covalentemente dos partes de un compuesto. Los enlaces normalmente comprenden un enlace directo o un átomo como oxígeno o azufre, una unidad como NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂ NH o una cadena de átomos, como, pero sin limitación, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterociclalquilo, heterociclalquenilo, heterociclalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquinilo, alquenilarilalquilo, alquenilarilalquenilo, alquenilarilalquinilo, alquinilarilalquilo, alquinilarilalquenilo, alquinilarilalquinilo, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquinilo, alquinheteroarilalquilo, alquinheteroarilalquenilo, alquinheteroarilalquinilo, alquinheteroarilalquilo, alquinheteroarilalquenilo, alquinheteroarilalquinilo, alquinheterociclalquilo, alquinheterociclalquenilo, alquinheterociclalquinilo, alquinheterociclalquilo, alquinheterociclalquenilo, alquinheterociclalquinilo, alquinheterociclalquilo, alquinheterociclalquenilo, alquinheterociclalquinilo, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquilheteroarilo, alquinheteroarilo, alquinheteroarilo, cuyos uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados por O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heterocíclico sustituido o no sustituido; donde R₈ es hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido. En una realización, el enlace tiene aproximadamente 1-24 átomos, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 u 8-16 átomos.

Un grupo de enlace escindible es aquel que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que al entrar en una célula diana se escinde para liberar las dos partes que el enlace mantiene unidas. En una realización ejemplar, el grupo de enlace escindible se escinde al menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o más, o al menos 100 veces. más rápido en una célula diana o bajo una primera condición de referencia (que puede, por ejemplo, seleccionarse para imitar o representar condiciones intracelulares) que en la sangre de un sujeto, o bajo una segunda condición de referencia (que puede, por ejemplo, seleccionarse para imitar o representar condiciones encontradas en la sangre o el suero).

Los grupos de enlace escindibles son susceptibles a los agentes de escisión, por ejemplo, pH, potencial redox o la presencia de moléculas degradativas. Generalmente, los agentes de escisión son más frecuentes o se encuentran en niveles o actividades más altos dentro de las células que en el suero o la sangre. Ejemplos de dichos agentes degradantes incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad de sustrato, incluyendo, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo de enlace escindible redox mediante reducción; esterasas; endosomas o agentes que pueden crear un ambiente ácido, por ejemplo, aquellos que dan como resultado un pH de cinco o menos; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo de enlace escindible por ácido actuando como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas de sustrato) y fosfatasas.

Un grupo enlace escindible, como un enlace disulfuro, puede ser susceptible al pH. El pH del suero humano es 7,4, mientras que el pH intracelular promedio es ligeramente más bajo, oscilando entre aproximadamente 7,1 y 7,3. Las endosomas tienen un pH más ácido, en el rango de 5,5 a 6,0, y los lisosomas tienen un pH aún más ácido, alrededor de 5,0. Algunos enlaces tendrán un grupo de enlace escindible que se escinde a un pH seleccionado, liberando así un lípido catiónico del ligando dentro de la célula, o en el compartimento deseado de la célula.

Un enlace puede incluir un grupo de enlace escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo de enlace escindible incorporado en un enlace puede depender de la célula a la que se dirige. Por ejemplo, un ligando dirigido al hígado puede unirse a un lípido catiónico a través de un enlace que incluye un grupo éster. Las células del hígado son ricas en esterasas y, por lo tanto, el enlace se escindirán más eficientemente en las células del hígado que en los tipos de células que no son ricas en esterasas. Otros tipos de células ricas en esterasas incluyen células del pulmón, la corteza renal y los testículos.

Los enlaces que contienen enlaces peptídicos se pueden utilizar cuando se dirigen a tipos de células ricas en peptidasas, como las células hepáticas y los sinoviocitos.

En general, la idoneidad de un grupo de enlace escindible candidato se puede evaluar probando la capacidad de un agente (o condición) degradante para escindir el grupo enlace candidato. También será deseable probar el grupo de enlace escindible candidato para determinar la capacidad de resistir la escisión en la sangre o cuando está en contacto con otro tejido no diana. Por lo tanto, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera y una segunda condición, donde la primera se selecciona para que sea indicativa de escisión en una célula diana y la segunda se selecciona para que sea indicativa de escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, por ejemplo,

sangre o suero. Las evaluaciones pueden realizarse en sistemas libres de células, en células, en cultivos celulares, en cultivos de órganos o tejidos, o en animales completos. Puede resultar útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones libres de células o de cultivo y confirmar mediante evaluaciones adicionales en animales enteros. En determinadas realizaciones, los compuestos
 5 candidatos útiles se escinden al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares).

10 *i. Grupos de enlace escindibles redox*

En determinadas realizaciones, un grupo de enlace escindible es un grupo de enlace escindible redox que se escinde tras reducción u oxidación. Un ejemplo de grupo de enlace escindible reductivamente es un grupo enlace disulfuro (-SS-). Para determinar si un grupo de enlace escindible candidato es un “grupo de enlace escindible reductivamente” adecuado o, por ejemplo, es adecuado
 15 para su uso con un oligonucleótido particular y un agente de direccionamiento particular, se pueden consultar los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un candidato puede evaluarse mediante incubación con ditioneitol (DTT) u otro agente reductor usando reactivos conocidos en la técnica, que imitan la velocidad de escisión que se observaría en una célula, por ejemplo, una célula diana. Los candidatos también pueden evaluarse en condiciones que se seleccionan para imitar las
 20 condiciones de la sangre o del suero. En uno de ellos, los compuestos candidatos se escinden como máximo en aproximadamente un 10% en la sangre. En otras realizaciones, los compuestos candidatos útiles se degradan al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o en condiciones *in vitro*
 25 seleccionadas para imitar condiciones extracelulares). La velocidad de escisión de los compuestos candidatos se puede determinar usando ensayos de cinética enzimática estándar en condiciones elegidas para imitar los medios intracelulares y en comparación con las condiciones elegidas para imitar los medios extracelulares.

30 *ii. Grupos de enlace escindibles a base de fosfato*

En otras realizaciones, un enlace escindible comprende un grupo de enlace escindible a base de fosfato. Un grupo de enlace escindible a base de fosfato se escinde mediante agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que escinde grupos fosfato en las células son enzimas como las fosfatasas en las células. Ejemplos de grupos de enlace basados en fosfato son -
 35 OP(O)(ORk)-O-, -OP(S)(ORk)-O-, -OP(S)(SRk)-O-, -SP(O)(ORk)-O-, -OP(O)(ORk)-S-, -SP(O)(ORk)-S-, -OP(S)(ORk)-S-, -SP(S)(ORk)-O-, -OP(O)(Rk)-O-, -OP(S)(Rk)-O-, -SP(O)(Rk)-O-, -SP(S)(Rk)-O-, -SP(O)(Rk)-S-, -OP(S)(Rk)-S-, donde Rk en cada aparición puede ser, independientemente, alquilo C1-C20, haloalquilo C1-C20, arilo C6-C10., o aralquilo C7-C12. Las realizaciones ejemplares incluyen -OP(O)(OH)-O-, -OP(S)(OH)-O-, -OP(S)(SH)-O-, -SP(O)(OH)-O-,
 40 -, -OP(O)(OH)-S-, -SP(O)(OH)-S-, -OP(S)(OH)-S-, -SP(S)(OH)-O-, -OP(O)(H)-O-, -OP(S)(H)-O-, -

SP(O)(H)-O-, -SP(S)(H)-O-, -SP(O)(H)-S-, y -OP(S)(H)-S-. En determinadas realizaciones, un grupo enlace basado en fosfato es -OP(O)(OH)-O-. Estos candidatos pueden evaluarse utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente. \

5 *III. Grupos de enlace escindibles con ácido*

En otras realizaciones, un enlace escindible comprende un grupo de enlace escindible con ácido. Un grupo de enlace escindible con ácido es un grupo enlace que se escinde en condiciones ácidas. En determinadas realizaciones, los grupos de enlace escindibles con ácido se escinden en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o inferior (p. ej., aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o inferior), o mediante agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, orgánulos específicos de pH bajo, como endosomas y lisosomas, pueden proporcionar un entorno de escisión para grupos de enlace escindibles con ácido. Ejemplos de grupos de enlace escindibles con ácido incluyen, entre otros, hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos. Los grupos escindibles por ácido pueden tener la fórmula general -C=NN-, C(O)O o -OC(O). Una realización ejemplar es cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, un grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario tal como dimetilpentilo o t-butilo. Estos candidatos pueden evaluarse utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

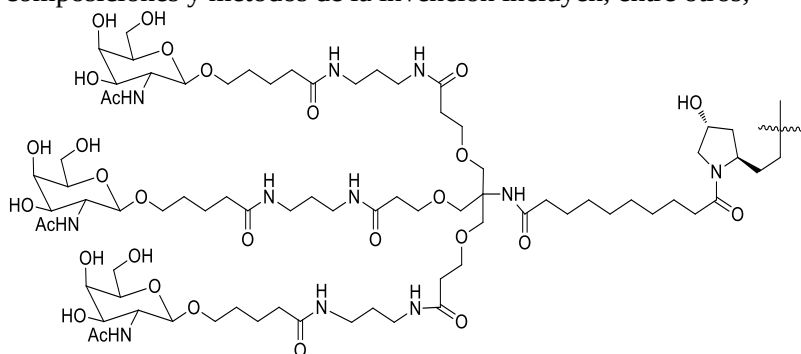
20 *IV. Grupos de enlace basados en éster*

En otras realizaciones, un enlace escindible comprende un grupo de enlace escindible basado en éster. Un grupo de enlace escindible basado en éster es escindido por enzimas como esterasas y amidasas en las células. Los ejemplos de grupos de enlace escindibles basados en éster incluyen, entre otros, ésteres de grupos alquilenos, alquenileno y alquinileno. Los grupos de enlace escindibles tipo éster tienen la fórmula general -C(O)O- o -OC(O)-. Estos candidatos pueden evaluarse utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

25 *v. Grupos de escisión basados en péptidos*

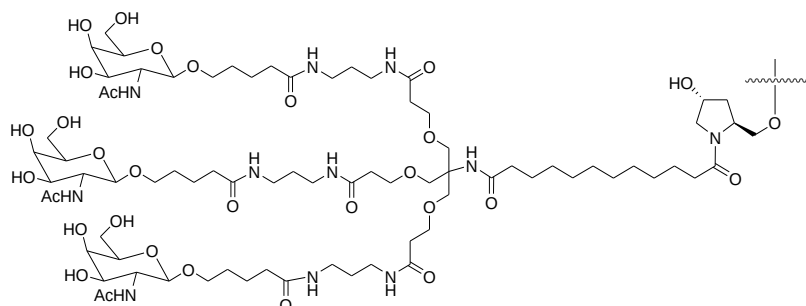
Aún en otras realizaciones, un enlace escindible comprende un grupo de enlace escindible basado en péptido. Un grupo de enlace escindible basado en péptidos es escindido por enzimas como peptidasas y proteasas en las células. Los grupos de enlace escindibles basados en péptidos son enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para producir oligopéptidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos, etc.) y polipéptidos. Los grupos escindibles basados en péptidos no incluyen el grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida puede formarse entre cualquier alquilenos, alquenileno o alquinileno. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace amida que se forma entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas. El grupo de escisión basado en péptidos generalmente se limita al enlace peptídico (es decir, el enlace amida) formado entre aminoácidos que producen péptidos y proteínas y no incluye el grupo funcional amida completo. Los grupos de enlace escindibles basados en péptidos tienen la fórmula general: NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, donde RA y RB son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos pueden evaluarse utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, un ARNi de la invención se conjuga con un carbohidrato a través de un enlace. Los ejemplos no limitantes de conjugados de carbohidratos de ARNi con enlaces de las composiciones y métodos de la invención incluyen, entre otros,

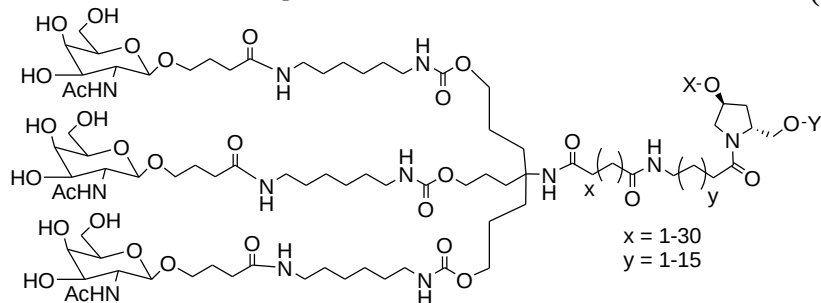


(Fórmula XXXVII),

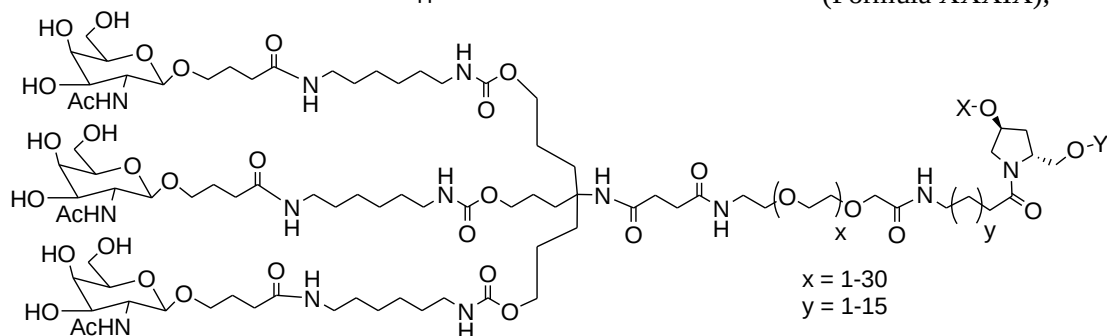
5



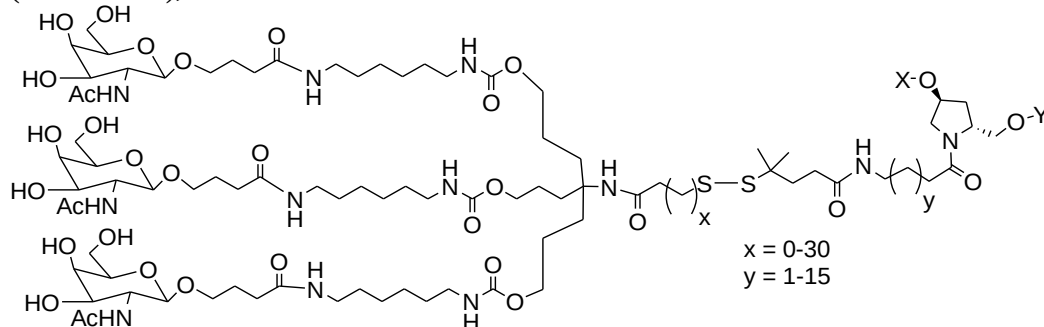
(Fórmula XXXVIII),



(Fórmula XXXIX),

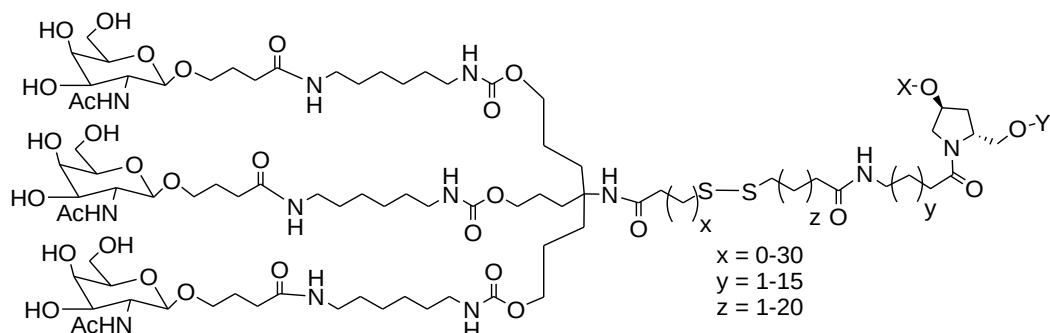


(Fórmula XL),

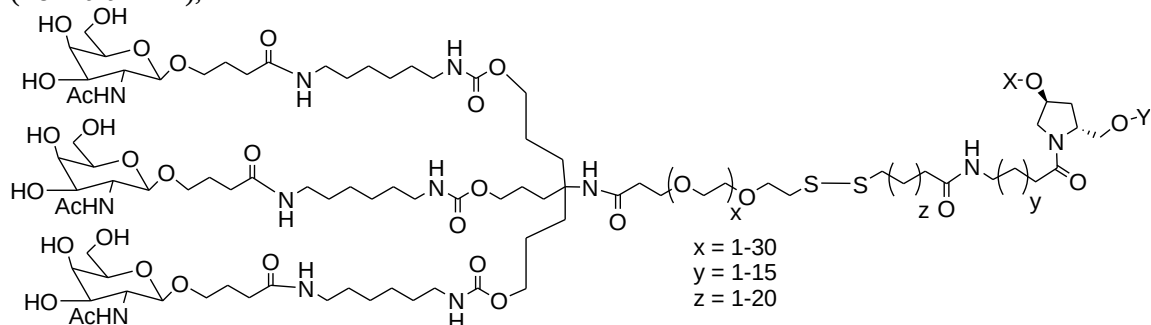


(Fórmula XLI),

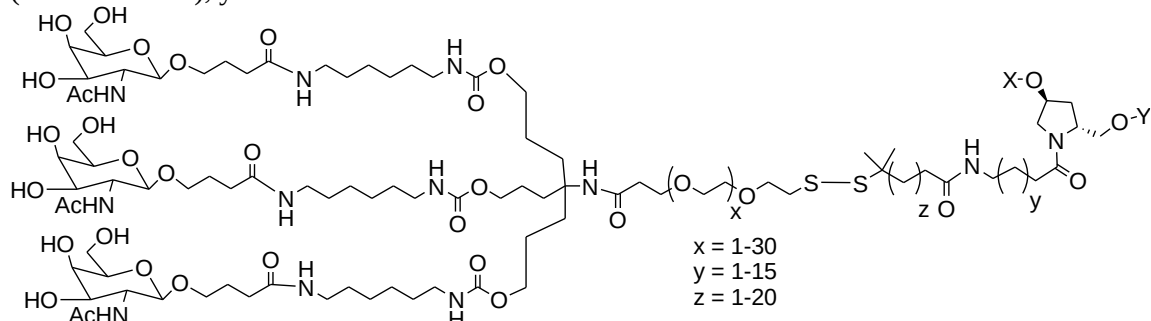
10



(Fórmula XLII),



5 (Fórmula XLIII), y



(Fórmula XLIV), cuando uno de X o Y es un oligonucleótido, el otro es un hidrógeno.

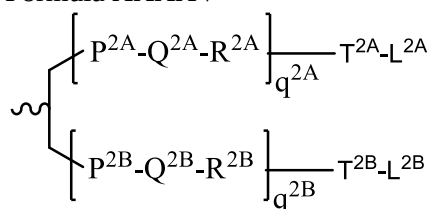
En ciertas realizaciones de las composiciones y métodos de la invención, un ligando es uno o más derivados de “GalNAc” (N-acetilgalactosamina) unidos a través de un enlace ramificado bivalente o

10

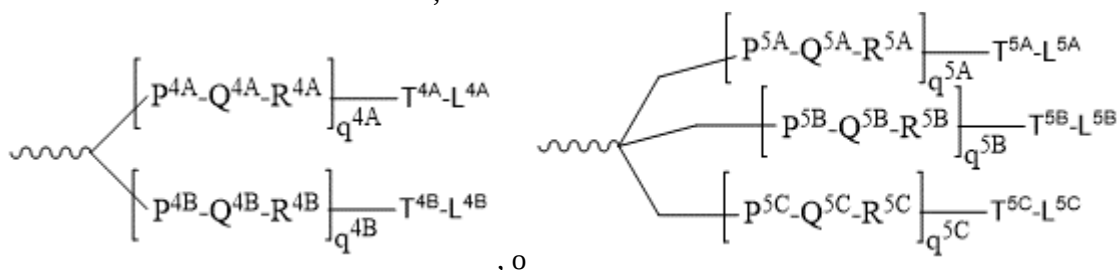
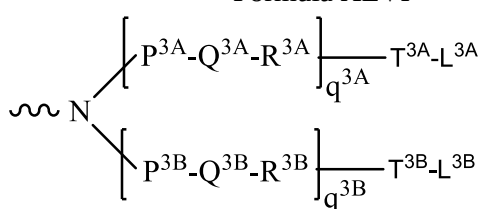
trivalente.

En una realización, un oligonucleótido de la invención se conjuga con un enlace ramificado bivalente o trivalente seleccionado del grupo de estructuras que se muestran en cualquiera de las fórmulas (XLV) – (XLVI):

Fórmula XXXV



Fórmula XLVI



Fórmula XL'

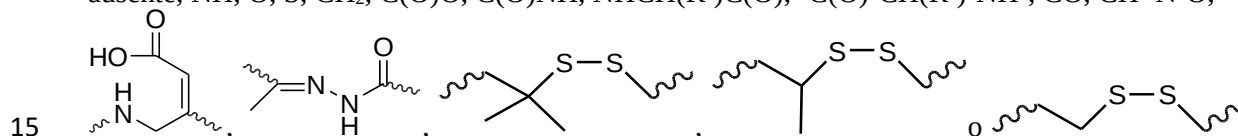
Fórmula -----

5 donde:

q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, q^{4A}, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B} y q^{5C} representan independientemente para cada aparición 0-20 y en donde la unidad repetitiva puede ser igual o diferente;

p^{2A}, p^{2B}, p^{3A}, p^{3B}, p^{4A}, p^{4B}, p^{5A}, p^{5B}, p^{5C}, t^{2A}, t^{2B}, t^{3A}, t^{3B}, t^{4A}, t^{4B}, t^{4A}, t^{5B}, t^{5C} están cada uno independientemente para cada aparición ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH or CH₂O; Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} están independientemente para cada aparición ausente, alquileo, alquileo sustituido en el que uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados por uno o más de O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

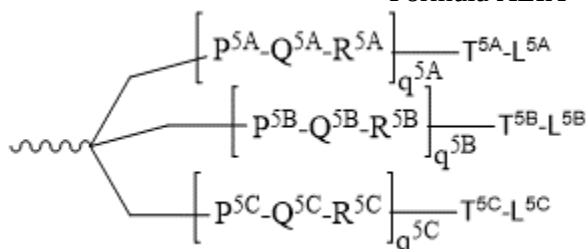
R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} están cada uno independientemente para cada aparición ausente, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



heterociclilo;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan el ligando; es decir, cada uno independientemente para cada aparición un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y R^a es H o cadena lateral de aminoácido. Los derivados conjugantes trivalentes de GalNAc son particularmente útiles para su uso con agentes de ARNi para inhibir la expresión de un gen diana, tales como los de fórmula (XLIX):

Fórmula XLIX



en donde L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, tal como un derivado de GalNAc.

Ejemplos de grupos de enlaces ramificados bivalentes y trivalentes adecuados que conjugan derivados de GalNAc incluyen, entre otras, las estructuras citadas anteriormente como fórmulas II, VII, XI, X y XIII.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de conjugados de oligonucleótidos incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses números 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; y 8,106,022, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto determinado se modifiquen uniformemente y, de hecho, se puede incorporar más de una de las modificaciones antes mencionadas en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos oligonucleotídicos que son compuestos quiméricos.

Por ejemplo, los compuestos de ARNi "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos de ARNi, tales como agentes de ARNi, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una formada por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNbc. Estos ARNi normalmente contienen al menos una región en la que el ARN se modifica para conferir al ARNi una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor captación celular o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la RNasa H da como resultado la escisión del ARN diana, lo que mejora en gran medida la eficacia de la inhibición de la expresión génica del ARNi. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con ARNi más cortos cuando se utilizan ARNbc quiméricos, en comparación con los ARNbc de fosforotioato desoxi que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN se puede detectar de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

En ciertos casos, el oligonucleótido puede ser modificado por un grupo que no es ligando. Se han conjugado varias moléculas que no son ligandos con oligonucleótidos para mejorar la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido, y los procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la literatura científica. Dichos restos no ligandos han incluido restos lipídicos, tales como colesterol (Kubo, T. *et al.*, *Bioquímica. Biofísica. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Nacional. Acad. Ciencia. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), un tioéter, *por ejemplo*, hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*,

1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), una cadena alifática, *por ejemplo*, dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), un fosfolípido, *por ejemplo*, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969), o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), un resto palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o una octadecilamina o resto hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Anteriormente se han enumerado patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de oligonucleótidos que llevan un aminoénlace en una o más posiciones de la secuencia. Luego, el grupo amino se hace reaccionar con la molécula que se está conjugando usando reactivos de activación o acoplamiento apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar con el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido o después de la escisión del oligonucleótido, en fase de solución. La purificación del conjugado de ARN mediante HPLC normalmente produce el conjugado puro.

B. Anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la invención

En algunas realizaciones, el modulador de la invención es un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a INHBE, *por ejemplo*, un anticuerpo monoclonal anti-INHBE, o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los moduladores de anticuerpos pueden identificarse, seleccionarse (*por ejemplo*, usando presentación en fagos) o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas mediante diversos ensayos conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Second edición, Greenfield, ed., 2014). La especificidad de unión de un anticuerpo por su antígeno se puede probar mediante métodos conocidos en la técnica tales como ELISA, transferencia Western o resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-INHBE o su fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo humanizado o su fragmento de unión a antígeno. Los anticuerpos humanizados pueden ser útiles como moléculas terapéuticas porque los anticuerpos humanizados pueden reducir o eliminar la respuesta inmune humana a anticuerpos no humanos (tales como la respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón), lo que puede dar como resultado una respuesta inmune a un anticuerpo terapéutico, y una disminución. efectividad de la terapéutica.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-INHBE o su fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico o su fragmento de unión a antígeno. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-INHBE o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende al menos una región variable

no humana y al menos una región constante humana. En algunas de dichas realizaciones, todas las regiones variables de un anticuerpo anti-INHBE son regiones variables no humanas, y todas las regiones constantes de un anticuerpo anti-INHBE son regiones constantes humanas. En algunas realizaciones, una o más regiones variables de un anticuerpo quimérico son regiones variables de
5 ratón. No es necesario que la región constante humana de un anticuerpo quimérico sea del mismo isotipo que la región constante no humana, si la hay, a la que reemplaza. Los anticuerpos quiméricos se analizan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison et al. Proc. Nacional. Acad. Ciencia. Estados Unidos 81: 6851-55 (1984).

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-INHBE o su fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo humano o su fragmento de unión a antígeno.

En algunas realizaciones, el modulador del anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo anti-INHBE o un fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo monoclonal anti-INHBE o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

15 En algunas realizaciones, el modulador del anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo anti-INHBE o su fragmento de unión al antígeno, es multiespecífico (por ejemplo, biespecífico). Un fragmento multiespecífico de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multiespecífico, incluidos los formatos de anticuerpos biespecíficos ejemplares descritos en el
20 presente documento, puede adaptarse para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas de rutina disponibles en la técnica.

Los moduladores de anticuerpos de la presente invención se pueden producir usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno se pueden producir usando métodos de ADN recombinante. Los vectores de expresión que
25 codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariótica o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección con DEAE-dextrano y similares.

30 Las células huésped pueden ser una célula procariótica o eucariota. El polinucleótido o vector que está presente en la célula huésped puede integrarse en el genoma de la célula huésped o puede mantenerse extracromosómicamente. La célula huésped puede ser cualquier célula procariótica o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal o humana. En algunas realizaciones, las células fúngicas son, por ejemplo, las del género *Saccharomyces*, en particular las de
35 la especie *S. cerevisiae*. El término "procariota" incluye todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con moléculas de ADN o ARN para la expresión de un anticuerpo o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina. Los huéspedes procariotas pueden incluir bacterias gram negativas así como bacterias gram positivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. El término "eucariota" incluye levaduras, plantas superiores,
40 insectos y células de vertebrados, por ejemplo, células de mamíferos, tales como células NSO y CHO.

Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los anticuerpos o las cadenas de inmunoglobulina codificadas por el polinucleótido pueden estar glicosilados o no glicosilados. Los anticuerpos o las correspondientes cadenas de inmunoglobulina también pueden incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial. Aunque es posible expresar anticuerpos en células huésped procarióticas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible, y más preferible en células huésped de mamíferos, porque dichas células eucariotas (y en particular células de mamíferos) tienen más probabilidades que las células procarióticas de expresar anticuerpos en células huésped procarióticas o eucariotas. ensamblar y secretar un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunológicamente activo.

En algunas realizaciones, una vez que se ha incorporado un vector en un huésped apropiado, el huésped puede mantenerse en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, la recolección y purificación de las cadenas ligeras, cadenas pesadas, pueden seguir dímeros de cadena ligera/pesada o anticuerpos intactos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos u otras formas de inmunoglobulina; véase Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, Nueva York, (1979). Así, se introducen polinucleótidos o vectores en las células que a su vez producen el anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo. Además, se pueden usar animales transgénicos, preferiblemente mamíferos, que comprenden las células huésped mencionadas anteriormente para la producción a gran escala del anticuerpo o fragmentos de anticuerpo del mismo.

Las células huésped transformadas se pueden cultivar en fermentadores y cultivar usando cualquier técnica adecuada para lograr un crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, otras formas de inmunoglobulinas o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluida la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel. y similares; véase Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, NY (1982). El anticuerpo o sus fragmentos de unión a antígeno se pueden aislar luego del medio de crecimiento, lisados celulares o fracciones de membrana celular. El aislamiento y la purificación de, por ejemplo, anticuerpos expresados microbianamente o fragmentos de unión a antígeno de los mismos puede realizarse mediante cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, *por ejemplo*, contra la región constante del anticuerpo.

Aspectos de la presente invención se refieren a un hibridoma, que proporciona una fuente indefinidamente prolongada de anticuerpos monoclonales. Como alternativa a la obtención de inmunoglobulinas directamente del cultivo de hibridomas, se pueden usar células de hibridoma immortalizadas como fuente de loci de cadena pesada y cadena ligera reordenados para la expresión posterior y/o manipulación genética. Los genes de anticuerpos reordenados se pueden transcribir de forma inversa a partir de ARNm apropiados para producir ADNc. En algunas realizaciones, la región constante de la cadena pesada puede intercambiarse por la de un isotipo diferente o eliminarse por completo. Las regiones variables se pueden vincular para codificar regiones Fv de cadena única. Se

pueden unir múltiples regiones Fv para conferir capacidad de unión a más de una diana o se pueden emplear combinaciones quiméricas de cadenas pesadas y ligeras. Puede usarse cualquier método apropiado para la clonación de regiones variables de anticuerpos y la generación de anticuerpos recombinantes y sus porciones de unión a antígeno.

5 En algunas realizaciones, se obtiene un ácido nucleico apropiado que codifica regiones variables de una cadena pesada y/o ligera y se inserta en vectores de expresión que pueden transfectarse en células huésped recombinantes estándar. Se puede utilizar una variedad de tales células huésped. En algunas realizaciones, las células huésped de mamífero pueden ser ventajosas para un procesamiento y producción eficientes. Las líneas celulares de mamíferos típicas útiles para este fin incluyen células CHO, células 293 o células NSO. La producción del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede llevarse a cabo cultivando un huésped recombinante modificado en condiciones de cultivo apropiadas para el crecimiento de las células huésped y la expresión de las secuencias codificantes. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden recuperarse aislandolos del cultivo. Los sistemas de expresión pueden diseñarse para incluir péptidos señal de modo que los anticuerpos resultantes se secreten al medio; sin embargo, también es posible la producción intracelular.

La presente invención también incluye un polinucleótido que codifica al menos una región variable de una cadena de inmunoglobulina de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la región variable codificada por el polinucleótido comprende al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de VH y/o VL de la región variable del anticuerpo producido por cualquiera de los hibridomas descritos anteriormente.

Los polinucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos del mismo pueden ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN producidos sintéticamente o una molécula de ácido nucleico quimérica producida recombinantemente que comprende cualquiera de esos polinucleótidos solos o en combinación. En algunas realizaciones, un polinucleótido es parte de un vector. Dichos vectores pueden comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas.

En algunas realizaciones, un polinucleótido está unido operativamente a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procarióticas o eucariotas. La expresión del polinucleótido comprende la transcripción del polinucleótido en un ARNm traducible. Los expertos en la técnica conocen bien los elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferiblemente células de mamíferos. Pueden incluir secuencias reguladoras que facilitan el inicio de la transcripción y, opcionalmente, señales poli-A que facilitan la terminación de la transcripción y la estabilización de la transcripción. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales y traduccionales y/o regiones promotoras heterólogas o naturalmente asociadas. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped procarióticas incluyen, *por ejemplo*, el promotor PL, Lac, Trp o Tac en *E. coli*, y ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas son el promotor AOX1 o GAL1 en levadura o el promotor CMV- promotor, promotor SV40, promotor RSV (virus del sarcoma de Rous), potenciador CMV, potenciador SV40 o un intrón de globina en células de mamíferos y otros animales.

Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden incluir señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, aguas abajo del polinucleótido. Además, dependiendo del sistema de expresión empleado, se pueden añadir a la secuencia codificante del polinucleótido

5 secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido a un compartimento celular o secretarlo al medio y se han descrito anteriormente. La secuencia líder se ensambla en la fase apropiada con secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de proteína traducida, o una porción de la misma, hacia, por ejemplo, el medio extracelular. Opcionalmente, se puede utilizar una secuencia de polinucleótidos heteróloga que codifica una

10 proteína de fusión que incluye un péptido de identificación C o N terminal que imparte las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican al menos el dominio variable de la cadena ligera y/o pesada pueden codificar los dominios variables de ambas cadenas de

15 inmunoglobulina o solo una. Asimismo, un polinucleótido puede estar bajo el control del mismo promotor o puede controlarse por separado para su expresión. Además, algunos aspectos se relacionan con vectores, particularmente plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos usados convencionalmente en ingeniería genética que comprenden un polinucleótido que codifica un dominio variable de una cadena de inmunoglobulina de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo;

20 opcionalmente en combinación con un polinucleótido que codifica el dominio variable de la otra cadena de inmunoglobulina del anticuerpo.

En algunas realizaciones, se proporcionan secuencias de control de la expresión como sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también se pueden usar secuencias de control para huéspedes procarióticos. Se

25 pueden usar vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes o virus del papiloma bovino para la administración de los polinucleótidos o del vector en una población celular diana (por ejemplo, para diseñar una célula para que exprese un anticuerpo). o fragmento de unión a antígeno del mismo). Se pueden utilizar diversos métodos apropiados para construir vectores virales recombinantes. En algunas realizaciones, los

30 polinucleótidos y vectores pueden reconstituirse en liposomas para su administración a células diana. Los vectores que contienen los polinucleótidos (por ejemplo, el(los) dominio(s) variable(s) pesado(s) y/o ligero(s) de las cadenas de inmunoglobulina que codifican secuencias y secuencias de control de expresión) pueden transferirse al interior de la célula huésped mediante métodos adecuados, que varían dependiendo del tipo de huésped celular.

35 Los anticuerpos monoclonales y sus fragmentos de unión a antígeno también pueden producirse mediante generación de hibridomas (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) Nature, 256: 495-499) de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera luego se analizan utilizando métodos estándar, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el análisis de resonancia de plasmón superficial (p. ej., OCTET o BIACORE), para identificar uno o

40 más hibridomas que producen un anticuerpo o un antígeno. porción de unión del mismo, que se une

específicamente a un antígeno específico, por ejemplo, INHBE, por ejemplo, INHBE de tipo salvaje o INHBE mutante. Puede usarse cualquier forma del antígeno especificado como inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas naturales, cualquier variante o fragmento de los mismos, así como su péptido antigénico (por ejemplo, cualquiera de los epítomos descritos en el presente documento como un epítomo lineal o dentro de un andamio como epítomo conformacional). Un método ejemplar para producir anticuerpos, y porciones de unión a antígeno de los mismos, incluye seleccionar bibliotecas de expresión de proteínas que expresan anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, scFv), por ejemplo, bibliotecas de presentación en fagos o ribosomas. La presentación en fagos se describe, por ejemplo, en Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.223.409; Smith (1985) Ciencia 228:1315-1317; Clackson y cols. (1991) Naturaleza, 352: 624-628; Marcas y col. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597 WO92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809.

Además del uso de bibliotecas de presentación, el antígeno especificado (por ejemplo, INHBE) se puede usar para inmunizar a un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, un hámster o una rata. En una realización, el animal no humano es un ratón.

En otra realización, se obtiene un anticuerpo monoclonal del animal no humano y luego se modifica, por ejemplo, quimérico, usando técnicas de ADN recombinante adecuadas. Se han descrito diversos enfoques para producir anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, Proc. Nacional. Acad. Ciencia. Estados Unidos 81:6851, 1985; Takeda *et al.*, Nature 314:452, 1985, Cabilly *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Boss *et al.*, patente de EE.UU. n° 4.816.397.

Para técnicas de producción de anticuerpos adicionales, consulte Antibodies: A Laboratory Manual, eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. La presente invención no se limita necesariamente a ninguna fuente, método de producción u otras características especiales particulares de un anticuerpo.

También se conocen en la técnica métodos para generar anticuerpos humanos en ratones transgénicos. Cualquiera de estos métodos conocidos se puede utilizar en el contexto de la presente invención para producir anticuerpos humanos que se unan específicamente al INHBE humano.

En alguna realización, se aíslan anticuerpos quiméricos de alta afinidad que tienen una región variable humana y una región constante de ratón. Los anticuerpos se caracterizan y seleccionan por características deseables, incluyendo afinidad, selectividad, epítomo, etc. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar el anticuerpo completamente humano de la invención, por ejemplo IgG1 o IgG4 de tipo salvaje o modificado. Si bien la región constante seleccionada puede variar según el uso específico, las características de alta afinidad de unión al antígeno y especificidad del diana residen en la región variable.

C. GuideRNA que efectúan la edición ADAR de la invención

La presente invención también proporciona ARN guía que efectúan la edición ADAR del gen INHBE. Cualquiera de los nucleótidos descritos en el presente documento (como los nucleótidos de las Tablas 2 a 5) se puede utilizar para diseñar ARN guía que efectúen la edición de ADAR. Los métodos para diseñar y preparar dichos ARN guía se describen, por ejemplo, en los documentos

WO2016097212A1, WO2017220751A1, US20210261955A1 y WO2018041973A1, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

D. GuideRNA que efectúan la edición CRISPR de la invención

La presente invención también proporciona ARN guía que efectúan la edición CRISPR del gen INHBE. Cualquiera de los nucleótidos descritos en el presente documento (como los nucleótidos de las Tablas 2 a 5) se puede utilizar para diseñar ARN guía que efectúen la edición CRISPR. Los métodos para diseñar y preparar dichos ARN guía se describen, por ejemplo, en los documentos US20200248180 y US20190316121, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

IV. Entrega de un Modulador de la Invención

La administración de un modulador de la invención a una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto que lo necesita, tal como un sujeto susceptible o diagnosticado con un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, trastorno metabólico, por ejemplo, El síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal) se pueden lograr de varias maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede realizar poniendo en contacto una célula con un modulador de la invención *in vitro* o *in vivo*. La administración *in vivo* también se puede realizar directamente administrando a un sujeto una composición que comprende un modulador. Alternativamente, la administración *in vivo* se puede realizar indirectamente administrando uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del modulador. Estas alternativas se analizan más adelante.

Con respecto a los moduladores de oligonucleótidos de la invención, por ejemplo, agente de ARNbc o agentes de polinucleótidos antisentido, en general, cualquier método para administrar una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) puede adaptarse para su uso con un ARNi de la invención (ver *ej.*, Akhtar S. y Julian RL (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 y WO94/02595, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar para administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula administrada, la prevención de efectos no específicos y la acumulación de la molécula administrada en el tejido diana. La interferencia de ARN también ha demostrado éxito con la administración local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G., *et al.* (2004) *Ácidos nucleicos* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Nacional. Acad. Ciencia. EE.UU.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602). La modificación del ARN o del vehículo farmacéutico también puede permitir dirigir el ARNi al tejido diana y evitar efectos indeseables fuera de la diana. Las moléculas de ARNi pueden modificarse mediante conjugación química con grupos lipófilos como el colesterol para mejorar la absorción celular y prevenir la degradación. Por ejemplo, se inyectó sistémicamente en

ratones un ARNi dirigido contra ApoB conjugado con un resto de colesterol lipófilo y dio como resultado la eliminación del ARNm de apoB tanto en el hígado como en el yeyuno (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178).

En una realización alternativa, el modulador se puede administrar usando sistemas de administración de fármacos tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónico. Por ejemplo, los sistemas de administración catiónicos cargados positivamente facilitan la unión de una molécula de ARNi (cargada negativamente) y también mejoran las interacciones en la membrana celular cargada negativamente para permitir la absorción eficiente de un ARNi por la célula. Los lípidos, dendrímeros o polímeros catiónicos pueden unirse a un ARNi o inducirse a formar una vesícula o micela (ver, por ejemplo, Kim SH, *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que encierra un ARNi. La formación de vesículas o micelas previene aún más la degradación del ARNi cuando se administra por vía sistémica. Los métodos para preparar y administrar complejos catiónicos-ARNi están dentro de las capacidades de un experto en la técnica (véase, *por ejemplo*, Sorensen, DR, *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de administración de fármacos útiles para la administración sistémica de ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), *supra*; Verma, UN, *et al* (2003), *supra*), "partículas lipídicas de ácido nucleico sólido" (Zimmermann, TS, *et al* (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY, *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME, *et al* (2008) *Pharm. Res.* Epub del 16 de agosto antes de la impresión; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), Arg- Péptidos Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) y poliamidoaminas (Tomalia, DA, *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). En algunas realizaciones, un ARNi forma un complejo con ciclodextrina para administración sistémica. Los métodos para la administración y las composiciones farmacéuticas de ARNi y ciclodextrinas se pueden encontrar en la patente estadounidense número 7.427.605, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Ciertos aspectos de la presente divulgación se relacionan con un método para reducir la expresión y/o actividad de INHBE en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con el modulador de la divulgación. En una realización, la célula es una célula hepática, opcionalmente un hepatocito. En una realización, la célula es una célula extrahepática.

A. Oligonucleótidos codificados por vectores de la invención

Los oligonucleótidos dirigidos al gen INHBE pueden expresarse a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A, *et al.*, Publicación Internacional PCT No. WO 00/22113, Conrad, Publicación Internacional PCT No. WO 00/22114, y Conrad, Patente de EE.UU. No. 6.054.299). La expresión puede ser transitoria (del orden de horas a semanas) o sostenida (de semanas a meses o más), dependiendo de la construcción específica utilizada y del tejido o tipo de célula diana. Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral,

que puede ser un vector integrante o no integrante. El transgén también puede construirse para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Los sistemas de vectores virales que se pueden utilizar con los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, entre otros, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, incluidos, entre otros, vectores lentivirales, virus de la leucemia murina Moloney, *etc.*; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores del virus del herpes simple; (e) vectores SV 40; (f) vectores de virus del polio; (g) vectores del virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores de virus de la viruela tales como un ortopox, por ejemplo, vectores del virus vaccinia o avipox, por ejemplo viruela canaria o viruela aviar; y (j) un adenovirus codicioso o dependiente de ayudante. Los virus con replicación defectuosa también pueden resultar ventajosos. Diferentes vectores se incorporarán o no al genoma de las células. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para transfección, si se desea. Alternativamente, la construcción se puede incorporar en vectores capaces de replicación episomal, por ejemplo, vectores EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un ARNi generalmente requerirán elementos reguladores, *por ejemplo*, promotores, potenciadores, *etc.*, para asegurar la expresión del ARNi en las células diana. En la técnica se conocen otros aspectos a considerar para vectores y construcciones.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los moduladores de la invención. En una realización, se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que contienen un modulador, como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen el modulador son útiles para prevenir o tratar un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, *por ejemplo*, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, *por ejemplo*, hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, trastornos del peso corporal.

Dichas composiciones farmacéuticas se formulan basándose en el modo de administración. Un ejemplo son las composiciones que se formulan para administración sistémica *mediante* administración parenteral, por ejemplo, mediante administración subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intravenosa (IV). Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosis suficientes para inhibir la expresión de un Gen INHBE.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención son estériles. En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención están libres de pirógenos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosis suficientes para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE. En general, una dosis adecuada de un modulador de la invención estará en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el rango de aproximadamente 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Normalmente, una dosis adecuada de un modulador de la invención estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg,

tal como aproximadamente 0,3 mg/kg y aproximadamente 3,0 mg/kg. Un régimen de dosis repetidas puede incluir la administración de una cantidad terapéutica de un modulador de forma regular, como cada mes, una vez cada 3 a 6 meses o una vez al año. En determinadas realizaciones, el modulador se administra aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada seis meses.

5 Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. La duración del tratamiento se puede determinar según la gravedad de la enfermedad.

 En otras realizaciones, una dosis única de las composiciones farmacéuticas puede ser duradera, de modo que las dosis se administren en intervalos no superiores a 1, 2, 3 o 4 meses. En
10 algunas realizaciones de la invención, se administra una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención aproximadamente una vez al mes. En otras realizaciones de la invención, se administra una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención trimestralmente (es decir, aproximadamente cada tres meses). En otras realizaciones de la invención, se administra una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención dos veces al año (es
15 decir, aproximadamente una vez cada seis meses).

 El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el momento requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, entre otros, mutaciones presentes en el sujeto, tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el
20 tratamiento de un sujeto con una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz, según corresponda, de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos.

 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (incluidas oftálmica, vaginal, rectal, intranasal, transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial,
25 subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmica, por ejemplo, a través de un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, mediante administración intraparenquimatosa, intratecal o intraventricular.

 El modulador puede administrarse de manera que se dirija a un tejido particular, tal como el hígado.

30 Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. También pueden resultar útiles condones recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las que los moduladores
35 presentados en la divulgación están mezclados con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas adecuados incluyen neutros (*p. ej.*, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, distearoilfosfatidil colina) negativos (*p. ej.*, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónicos (*p. ej.*, dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP y
40 dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Los moduladores presentados en la divulgación pueden

encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los moduladores pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, entre otros, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un éster alquílico C1-20 (por ejemplo, miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en el documento US 6.747.014, que se incorpora aquí como referencia.

En una realización, los moduladores de la invención se administran a una célula en una composición farmacéutica mediante una vía de administración tópica. En una realización, la composición farmacéutica puede incluir un modulador mezclado con un agente de administración tópica. El agente de administración tópica puede ser una pluralidad de vesículas microscópicas. Las vesículas microscópicas pueden ser liposomas. En algunas realizaciones, los liposomas son liposomas catiónicos.

En otra realización, el modulador se mezcla con un potenciador de la penetración tópica. En una realización, el potenciador de la penetración tópica es un ácido graso. El ácido graso puede ser ácido araquidónico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un éster alquílico C1-10, monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, el potenciador de la penetración tópica es una sal biliar. La sal biliar puede ser ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio, glicodihidrofusidato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otra realización, el potenciador de la penetración es un agente quelante. El agente quelante puede ser EDTA, ácido cítrico, un salicilato, un derivado N-acílico de colágeno, laureth-9, un derivado N-aminoacílico de una beta-dicetona o una mezcla de los mismos.

En otra realización, el potenciador de la penetración es un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo iónico o no iónico. El tensioactivo puede ser laurilsulfato de sodio, polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetiléter, una emulsión perfluoroquímica o una mezcla de los mismos.

En otra realización, el potenciador de la penetración se puede seleccionar de un grupo que consiste en ureas cíclicas insaturadas, 1-alkil-alcanonas, 1-alkenilazaciclo-alcanonas, agentes antiinflamatorios esteroides y mezclas de los mismos. En otra realización más, el potenciador de la penetración puede ser un glicol, un pirrol, una azona o un terpeno.

En un aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que incluye un modulador en una forma de dosificación inyectable. En una realización, la forma de dosificación inyectable de la composición farmacéutica incluye soluciones o dispersiones acuosas estériles y

polvos estériles. En algunas realizaciones, la solución estéril puede incluir un diluyente como agua; solución salina; aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina o propilenglicol.

Los moduladores de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones incluyen típicamente una o más especies de modulador y un vehículo

farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que el lenguaje "portador farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica a una célula, por ejemplo, una célula del hígado. El uso de tales medios y agentes para sustancias

farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, entre otras, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de componentes que incluyen, entre otros, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. Las formulaciones incluyen aquellas que se dirigen al hígado.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos.

A. Formulaciones adicionales

i. Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotas que generalmente exceden los 0,1 μm de diámetro (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich NG., and Ansel HC., 2004)., Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, pág. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, Volumen 1, página 245; Block en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 2, página 335; Higuchi *et al.*, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1985, p. 301). Las emulsiones son a menudo sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser del tipo agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide

finamente y se dispersa como gotas diminutas en una fase oleosa en masa, la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa como gotitas diminutas en una fase acuosa en masa, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo, que puede estar presente como una solución en la fase acuosa, en la fase oleosa o como fase separada. Los excipientes farmacéuticos como emulsionantes, estabilizadores, colorantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las emulsiones según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que constan de más de dos fases, como, por ejemplo, en el caso de aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua en aceite en Emulsiones de agua (w/o/w). Estas formulaciones complejas a menudo proporcionan ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no ofrecen. Las emulsiones múltiples en las que las gotas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotas de agua constituyen una emulsión w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizadas en una fase oleosa continua proporciona una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por tener poca o ninguna estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma mediante emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Otros medios para estabilizar emulsiones implican el uso de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquiera de las fases de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar en términos generales en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, pág.199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes tensioactivos, han encontrado una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y han sido revisados en la literatura (ver, *por ejemplo*, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, página 285; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1988, volumen 1, página 199). Los tensioactivos son típicamente anfifílicos y comprenden una porción hidrófila y una porción hidrófoba. La relación entre la naturaleza hidrófila e hidrófoba del tensioactivo se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para categorizar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases según la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros (ver, *por ejemplo*, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, pág.285).

En las formulaciones de emulsión también se incluye una gran variedad de materiales no emulsionantes que contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, página 335; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, página 199).

La aplicación de formulaciones en emulsión *por vía* dermatológica, oral y parenteral, y los métodos para su fabricación, se han revisado en la literatura (ver, *por ejemplo*, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, pág.199).

ii. Microemulsiones

En una realización de la presente invención, las composiciones de moduladores se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una única solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (ver, *por ejemplo*, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, volumen 1, pág.245). Normalmente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución tensioactiva acuosa y luego añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia, para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones isotrópicamente claras, termodinámicamente estables, de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215).

III. Micropartículas

Un modulador de la invención puede incorporarse en una partícula, por ejemplo, una micropartícula. Las micropartículas se pueden producir mediante secado por aspersión, pero también se pueden producir mediante otros métodos que incluyen liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado al vacío o una combinación de estas técnicas.

IV. Potenciadores de penetración

En una realización, la presente invención emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficaz de moduladores, por ejemplo, ácidos nucleicos, particularmente ARNi, a la piel de los animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución tanto en

forma ionizada como no ionizada. Sin embargo, normalmente sólo los fármacos lipófilos o solubles en lípidos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada una de las clases de potenciadores de la penetración mencionadas anteriormente y su uso en la fabricación de composiciones farmacéuticas y administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica.

v. *Excipientes*

A diferencia de un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte farmacéuticamente aceptable para administrar uno o más moduladores a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la forma de administración planificada, de modo que proporcione el volumen, la consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica determinada. Dichos agentes son bien conocidos en la técnica.

vi. *Otros componentes*

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales compatibles tales como, por ejemplo, agentes antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones. de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes o sustancias aromáticas, y similares que no interactúan perjudicialmente con el ácido nucleico de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluidos, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas presentadas en la invención incluyen (a) uno o más agentes polinucleotídicos antisentido y (b) uno o más agentes que funcionan mediante un mecanismo de inhibición no antisentido y que son útiles en el tratamiento de un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico.

La toxicidad y la eficacia profiláctica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis profilácticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos elevados.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular una variedad de dosis para uso en humanos. La dosificación de las composiciones presentadas en la presente invención se encuentra generalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50, tal como una ED80 o una ED90, con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos presentados en la invención, la dosis profilácticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración en plasma circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia diana (por ejemplo, lograr una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que alcanza la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) o niveles más altos de inhibición según se determina en cultivo celular. Esta información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración, como se analizó anteriormente, los moduladores presentados en la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos usados para la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico. En cualquier caso, el médico administrador puede ajustar la cantidad y el momento de la administración de ARNi en función de los resultados observados utilizando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

VI. Métodos para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE

La presente invención también proporciona métodos para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en una célula. Los métodos incluyen poner en contacto una célula con un modulador, por ejemplo, un agente de ARN bicatenario, un agente polinucleotídico antisentido, un anticuerpo, un ARN guía que efectúa la edición de ADAR o un ARN guía que afecta la edición de CRISPR, en una

cantidad eficaz para inhibir la expresión y/o la actividad de INHBE en la célula, inhibiendo así la expresión y/o actividad de INHBE en la célula. En algunas realizaciones de la divulgación, la expresión de un gen INHBE se inhibe preferentemente en el hígado (por ejemplo, hepatocitos).

El contacto de una célula con un modulador puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Poner en contacto una célula *in vivo* con el modulador incluye poner en contacto una célula o grupo de células dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, con el modulador. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* para poner en contacto una célula. El contacto con una célula puede ser directo o indirecto, como se analizó anteriormente. Además, el contacto con una célula se puede lograr mediante un ligando de direccionamiento, incluido cualquier ligando descrito en el presente documento o conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el ligando de direccionamiento es un resto de carbohidrato, por ejemplo, un ligando de GalNAc₃ o cualquier otro ligando que dirija el agente modulador a un sitio de interés.

El término "inhibir", tal como se usa en este documento, se usa indistintamente con "reducir", "silenciar", "regular a la baja", "suprimir" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase "inhibir la expresión y/o actividad de INHBE" pretende referirse a la inhibición de la expresión de cualquier INHBE (tal como, por ejemplo, un gen INHBE de ratón, un gen INHBE de rata, un gen INHBE de mono o un gen INHBE humano). así como variantes o mutantes de un gen INHBE. Por lo tanto, el gen INHBE puede ser un gen INHBE de tipo salvaje, un gen INHBE mutante o un gen INHBE transgénico en el contexto de una célula, grupo de células u organismo manipulado genéticamente.

"Inhibir la expresión y/o actividad de INHBE" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen INHBE, por ejemplo, al menos supresión parcial de la expresión y/o actividad de INHBE. La expresión y/o actividad de INHBE se puede evaluar basándose en el nivel, o el cambio en el nivel, de cualquier variable asociada con la expresión del gen INHBE, por ejemplo, nivel de ARNm de INHBE o nivel de proteína INHBE. Se entiende que INHBE se expresa predominantemente en el hígado.

La expresión y/o actividad de INHBE también se puede evaluar indirectamente basándose en otras variables asociadas con la expresión del gen INHBE, por ejemplo, nivel de expresión de la subunidad beta E de inhibina en el citoplasma, localización nuclear de la subunidad beta E de inhibina o expresión de ciertos genes diana u otros genes bajo control de transcripción de la subunidad beta E de la inhibina.

La inhibición puede evaluarse mediante una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más variables que están asociadas con la expresión y/o actividad de INHBE en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utilice en la técnica, por ejemplo, un nivel inicial previo a la dosis, o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que no está tratado o está tratado con un control (tal como, por ejemplo, control de sólo buffer o control de agente inactivo).

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, la expresión y/o actividad de INHBE se inhibe en al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95%, o por debajo del nivel de detección del ensayo. En algunas realizaciones, la expresión y/o actividad de

INHBE se inhibe en al menos un 70 %. Se entiende además que puede ser deseable la inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE en ciertos tejidos, por ejemplo, en el hígado, sin una inhibición significativa de la expresión en otros tejidos, por ejemplo, el cerebro.

En determinadas realizaciones, la inhibición de la expresión y/o actividad *in vivo* se determina mediante la desactivación del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, por ejemplo, un ratón infectado con AAV que expresa el gen diana humano (es decir, INHBE), por ejemplo, cuando administrado como una dosis única, por ejemplo, a 3 mg/kg en el punto más bajo de la expresión del ARN. También se puede determinar la reducción de la expresión de un gen endógeno en un sistema animal modelo, por ejemplo, después de la administración de una dosis única de, por ejemplo, 3 mg/kg en el punto más bajo de la expresión del ARN. Dichos sistemas son útiles cuando la secuencia de ácido nucleico del gen humano y el gen animal modelo están lo suficientemente cerca como para que el ARNi humano proporcione una desactivación eficaz del gen animal modelo. La expresión de ARN en el hígado se determina usando los métodos de PCR proporcionados en el Ejemplo 2.

La inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE puede manifestarse mediante una reducción de la cantidad de ARNm expresado por una primera célula o grupo de células (dichas células pueden estar presentes, por ejemplo, en una muestra derivada de un sujeto) en la que se transcribe INHBE y que ha sido o ha sido tratado (por ejemplo, poniendo en contacto la célula o células con un modulador de la invención, o administrando un modulador de la invención a un sujeto en el que las células están o estuvieron presentes) de manera que la expresión de un gen INHBE se inhibe, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no ha sido o no ha sido tratada de esa manera (células de control no tratadas con un modulador o no tratados con un modulador dirigido al gen de interés). En algunas realizaciones, la inhibición se evalúa mediante el método proporcionado en el Ejemplo 2 usando una concentración de ARNi de 10 nM en la línea celular de especies coincidentes y expresando el nivel de ARNm en las células tratadas como un porcentaje del nivel de ARNm en las células de control, usando lo siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{ARNm en células control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células control})} \cdot 100\%$$

En otras realizaciones, la inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE se puede evaluar en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente vinculado a la expresión del gen INHBE, por ejemplo, el nivel de proteína INHBE en sangre o suero de un sujeto. El silenciamiento del gen INHBE se puede determinar en cualquier célula que exprese INHBE, ya sea endógena o heteróloga a partir de una construcción de expresión, y mediante cualquier ensayo conocido en la técnica.

La inhibición de la expresión y/o actividad de una proteína INHBE puede manifestarse por una reducción en el nivel de la proteína INHBE que se expresa por una célula o grupo de células o en una muestra del sujeto (p. ej., el nivel de proteína en una muestra de sangre derivada de un sujeto). Como se explicó anteriormente, para la evaluación de la supresión del ARNm, la inhibición de los niveles de

expresión de proteínas en una célula o grupo de células tratadas puede expresarse de manera similar como un porcentaje del nivel de proteína en una célula o grupo de células de control, o el cambio en el nivel de proteína en una muestra del sujeto, por ejemplo, sangre o suero derivado de la misma.

Una célula de control, un grupo de células o una muestra de un sujeto que puede usarse para evaluar la inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE incluye una célula, un grupo de células o una muestra de un sujeto que aún no se ha puesto en contacto con un agente modulador de la invención. Por ejemplo, la célula de control, el grupo de células o la muestra del sujeto pueden derivarse de un sujeto individual (por ejemplo, un sujeto humano o animal) antes del tratamiento del sujeto con un modulador o un control de población apropiadamente emparejado.

El nivel de ARNm de INHBE que se expresa por una célula o grupo de células se puede determinar usando cualquier método conocido en la técnica para evaluar la expresión de ARNm. En una realización, el nivel de expresión de INHBE en una muestra se determina detectando un polinucleótido transcrito, o una porción del mismo, por ejemplo, ARNm del gen INHBE. El ARN se puede extraer de las células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, usando extracción ácida con fenol/isotiocianato de guanidina (RNAzol B; Biogenesis), RNeasy™ ARN kits de preparación (Qiagen®) or PAXgene™ (PreAnalytix™, Switzerland). Los formatos de ensayo típicos que utilizan hibridación con ácido ribonucleico incluyen ensayos nucleares, RT-PCR, ensayos de protección de ARNasa, transferencia Northern, hibridación *in situ* y análisis de microarrays.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de INHBE se determina utilizando una sonda de ácido nucleico. El término "sonda", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse selectivamente a un INHBE específico. Las sondas pueden ser sintetizadas por un experto en la técnica o derivadas de preparaciones biológicas apropiadas. Las sondas pueden estar diseñadas específicamente para ser etiquetadas. Ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, entre otros, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, entre otros, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y matrices de sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm de INHBE. En una realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo haciendo pasar el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en una matriz de chip genético Affymetrix®. Un experto en la materia puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la determinación del nivel de ARNm de INHBE.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de INHBE en una muestra implica el proceso de amplificación de ácido nucleico o transcriptasa inversa (para preparar ADNc) de, por ejemplo, ARNm en la muestra, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, Patente de EE.UU. n° 4.683.202), reacción en cadena de ligasa (Barany

(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicación en círculo rodante (Lizardi *et al.*, patente de EE.UU. n°

5 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. el arte. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en cantidades muy bajas. En aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión de INHBE se determina mediante RT-PCR fluorogénica cuantitativa
10 (es decir, el sistema TaqManTM). En algunas realizaciones, el nivel de expresión se determina mediante el método proporcionado en el Ejemplo 2 usando, por ejemplo, una concentración de ARNip de 10 nM, en la línea celular de especies coincidentes.

Los niveles de expresión de ARNm de INHBE se pueden controlar usando una transferencia de membrana (tal como la utilizada en análisis de hibridación tal como Northern, Southern, dot y
15 similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las patentes de EE.UU. Nos. 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934, que se incorporan en el presente documento como referencia. La determinación del nivel de expresión de INHBE también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

20 En algunas realizaciones, el nivel de expresión de ARNm se evalúa utilizando ensayos de ADN ramificado (ADNb) o PCR en tiempo real (qPCR). El uso de estos métodos se describe y ejemplifica en los Ejemplos presentados en el presente documento. En algunas realizaciones, el nivel de expresión se determina mediante el método proporcionado en el Ejemplo 2 usando una concentración de ARNip de 10 nM en la línea celular de especies coincidentes.

25 El nivel de expresión de la proteína INHBE se puede determinar usando cualquier método conocido en la técnica para medir los niveles de proteína. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitina en fluido o gel, espectroscopia de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de
30 flujo, inmunodifusión. (simple o doble), inmunoelectroforesis, transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, ensayos de electroquimioluminiscencia y similares.

En algunas realizaciones, la eficacia de los métodos de la invención se evalúa mediante una disminución en el nivel de proteína o ARNm de INHBE (por ejemplo, en una biopsia de hígado).

35 En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el modulador se administra a un sujeto de manera que el modulador se administra a un sitio específico dentro del sujeto. La inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE se puede evaluar usando mediciones del nivel o cambio en el nivel de ARNm de INHBE o proteína INHBE en una muestra derivada de fluido o tejido del sitio específico dentro del sujeto (por ejemplo, hígado o sangre).

Tal como se usan en el presente documento, se entiende que los términos detectar o determinar un nivel de un analito significan realizar los pasos para determinar si un material, por ejemplo, proteína, ARN, está presente. Como se usa en el presente documento, los métodos de detección o determinación incluyen la detección o determinación de un nivel de analito que está por debajo del nivel de detección para el método usado.

VII. Métodos profilácticos y de tratamiento de la invención.

La presente invención también proporciona métodos para usar un modulador de la invención o una composición que contiene un modulador de la invención para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE, previniendo o tratando así un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico., un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal. En los métodos de la invención, la célula puede ponerse en contacto con el modulador *in vitro* o *in vivo*, es decir, la célula puede estar dentro de un sujeto.

Una célula adecuada para el tratamiento usando los métodos de la invención puede ser cualquier célula que exprese un gen INHBE, por ejemplo, una célula hepática. Una célula adecuada para su uso en los métodos de la invención puede ser una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de primate (tal como una célula humana, incluyendo una célula humana en un animal no humano quimérico, o una célula de primate no humano, por ejemplo, una célula de mono o una célula de chimpancé), o una célula de no primate. En determinadas realizaciones, la célula es una célula humana, por ejemplo, una célula de hígado humano. En los métodos de la invención, la expresión de INHBE se inhibe en la célula en al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95, o hasta un nivel por debajo del nivel de detección del ensayo.

Los métodos *in vivo* de la invención pueden incluir administrar a un sujeto una composición que contiene un modulador, tal como un oligonucleótido, por ejemplo, donde el oligonucleótido incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN del gen INHBE del mamífero al que se va a administrar el agente de ARNi. La composición se puede administrar por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, entre otras, vía oral, intraperitoneal o parenteral, incluyendo intracraneal (por ejemplo, intraventricular, intraparenquimatosa e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, vía aérea (aerosol), nasal, rectal, intraocular (p. ej., inyección periocular, conjuntival, subtenoniana, intracameral, intravítrea, intraocular, yuxtaescleral anterior o posterior, subretiniana, subconjuntival, retrobulbar o intracanalicular), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, vía aérea (aerosol) y administración tópica (incluidas bucal y sublingual).

En determinadas realizaciones, las composiciones se administran mediante infusión o inyección intravenosa. En determinadas realizaciones, las composiciones se administran mediante inyección subcutánea. En determinadas realizaciones, las composiciones se administran mediante inyección intramuscular.

El modo de administración se puede elegir en función de si se desea un tratamiento local o sistémico y en función del área a tratar. La ruta y el sitio de administración se pueden elegir para mejorar la focalización.

En un aspecto, la presente invención también proporciona métodos para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en un mamífero. Los métodos incluyen administrar al mamífero una composición que comprende un modulador, tal como un oligonucleótido, por ejemplo, un oligonucleótido que se dirige a un gen INHBE, en una célula del mamífero y mantener al mamífero durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de el gen INHBE, inhibiendo así la expresión y/o actividad de INHBE en la célula. La reducción de la expresión y/o la actividad se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica y mediante métodos, por ejemplo, qRT-PCR, descritos en el presente documento, por ejemplo, en el Ejemplo 2. La reducción en la producción de proteínas se puede evaluar mediante cualquier método conocido en la técnica. por ejemplo, ELISA. En ciertas realizaciones, una muestra de biopsia de hígado por punción sirve como material de tejido para monitorear la reducción en la expresión del gen o proteína INHBE. En otras realizaciones, una muestra de sangre sirve como muestra objeto para controlar la reducción en la expresión y/o actividad de la proteína INHBE.

La presente invención proporciona además métodos de tratamiento en un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto diagnosticado con un trastorno asociado a INHBE, tal como un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, pre -diabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal.

La presente invención proporciona además métodos de profilaxis en un sujeto que los necesita. Los métodos de tratamiento de la invención incluyen administrar un modulador de la invención a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que se beneficiaría de una reducción de la expresión de INHBE, en una cantidad profilácticamente eficaz de un ARNbc dirigido a un gen INHBE o una composición farmacéutica que comprende un modulador de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción de INHBE. expresión y/o actividad, por ejemplo, un trastorno asociado a INHBE, tal como un trastorno metabólico, por ejemplo, diabetes.

El tratamiento de un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE incluye tratamiento terapéutico (por ejemplo, un sujeto tiene un trastorno metabólico) y tratamiento profiláctico (por ejemplo, el sujeto no tiene un trastorno metabólico o un sujeto puede tener riesgo de desarrollar un trastorno metabólico).

En algunas realizaciones, el trastorno asociado a INHBE es un trastorno metabólico. Los ejemplos de trastorno metabólico incluyen, entre otros, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, trastornos del peso corporal.

En algunas realizaciones, el trastorno asociado a INHBE es síndrome metabólico.

En algunas realizaciones, el modulador se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en una célula dentro del sujeto. La cantidad eficaz para

inhibir la expresión y/o actividad de INHBE en una célula dentro de un sujeto se puede evaluar usando los métodos discutidos anteriormente, incluidos métodos que implican la evaluación de la inhibición del ARNm de INHBE, la proteína INHBE o variables relacionadas, tales como la circunferencia de la cintura.

Con respecto al oligonucleótido de la invención, un oligonucleótido de la invención puede administrarse como un "oligonucleótido libre". Se administra un oligonucleótido libre en ausencia de una composición farmacéutica. El oligonucleótido desnudo puede estar en una solución tampón adecuada. La solución tampón puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la solución tampón es solución salina tamponada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución tampón que contiene el oligonucleótido se pueden ajustar de manera que sea adecuada para administrar a un sujeto. Alternativamente, se puede administrar un oligonucleótido de la invención como una composición farmacéutica, tal como una formulación liposomal de oligonucleótido.

Los sujetos que se beneficiarían de una inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE son sujetos susceptibles o diagnosticados con un trastorno asociado a INHBE, tal como un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, pre -diabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, una hiperlipidemia, hipertensión, una enfermedad cardiovascular, un trastorno del peso corporal. En una realización, el método incluye administrar una composición presentada en el presente documento de modo que la expresión y/o actividad de INHBE disminuya, como durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 o 3 -6 meses por dosis. En determinadas realizaciones, la composición se administra una vez cada 3-6 meses.

En una realización, los moduladores útiles para los métodos y composiciones presentados en el presente documento se dirigen específicamente a los ARN (primarios o procesados) del gen INHBE diana. Las composiciones y métodos para inhibir la expresión de estos genes usando ARNi se pueden preparar y realizar como se describe en el presente documento.

La administración del modulador según los métodos de la invención puede dar como resultado la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado a INHBE, por ejemplo, un trastorno metabólico, por ejemplo, síndrome metabólico, un trastorno de los carbohidratos, por ejemplo, diabetes tipo II, prediabetes, un trastorno del metabolismo de los lípidos, por ejemplo, hiperlipidemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular, trastornos del peso corporal. A los sujetos se les puede administrar una cantidad terapéutica de modulador, tal como aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg.

En una realización, el modulador se administra por vía subcutánea, es decir, mediante inyección subcutánea. Se pueden usar una o más inyecciones para administrar la dosis deseada de modulador a un sujeto. Las inyecciones pueden repetirse durante un período de tiempo.

La administración podrá repetirse periódicamente. En determinadas realizaciones, después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. Un régimen de dosis repetidas puede incluir la administración de una cantidad terapéutica de modulador de forma regular, como por ejemplo una vez al mes o una vez al año. En determinadas realizaciones,

el modulador se administra aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada tres meses, o aproximadamente una vez cada tres meses a aproximadamente una vez cada seis meses.

La invención proporciona además métodos y usos de un modulador o una composición farmacéutica del mismo para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción y/o inhibición de la expresión y/o actividad de INHBE, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno asociado a INHBE, en combinación con otros productos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, por ejemplo, con productos farmacéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos, tales como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar estos trastornos.

Por consiguiente, en algunos aspectos de la invención, los métodos que incluyen la administración de un modulador de la invención incluyen además la administración al sujeto de uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, un modulador de la invención se administra en combinación con, por ejemplo, un agente útil para tratar un trastorno asociado a INHBE como se describe en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica. Por ejemplo, agentes y tratamientos adicionales adecuados para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción en la expresión y/o actividad de INHBE, por ejemplo, un sujeto que tiene un trastorno asociado a INHBE, pueden incluir agentes utilizados actualmente para tratar los síntomas del trastorno asociado a INHBE.

Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que se pueden usar con un modulador de la invención incluyen, entre otros, insulina, un agonista del péptido 1 similar al glucagón (p. ej., exenatida, liraglutida, dulaglutida, semaglutida y pramlintida, una sulfonilurea (p. ej., clorpropamida, glipizida), una seglitinida (p. ej., repaglinida, nateglinidie), biguanidas (p. ej., metformina), una tiazolidinediona, por ejemplo, rosiglitazona, troglitazona, un inhibidor de la alfa-glucosidasa (por ejemplo, acarbosa y meglitol), un inhibidor de SGLT2 (por ejemplo, dapagliflozina), un inhibidor de DPP-4 (por ejemplo, linagliptina) o un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, *por ejemplo*, estatinas, como atorvastatina (Lipitor), fluvastatina (Lescol), lovastatina (Mevacor), lovastatina de liberación prolongada (Altoprev), pitavastatina (Livalo), pravastatina (Pravachol), rosuvastatina (Crestor) y simvastatina (Zocor).

El modulador y un agente terapéutico y/o tratamiento adicional se pueden administrar al mismo tiempo y/o en la misma combinación, por ejemplo, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional se puede administrar como parte de una composición separada o en momentos separados y/o o mediante otro método conocido en la técnica o descrito en el presente documento.

VIII. Kits

En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona kits que incluyen un recipiente adecuado que contiene una formulación farmacéutica de un modulador de la invención.

Dichos kits incluyen uno o más moduladores e instrucciones de uso, por ejemplo, instrucciones para administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de modulador (es). El modulador puede estar en un vial o en una jeringa precargada. Los kits pueden comprender además opcionalmente medios para administrar el modulador (por ejemplo, un dispositivo de inyección, tal

como una jeringa precargada), o medios para medir la inhibición de INHBE (por ejemplo, medios para medir la inhibición de ARNm de INHBE, proteína INHBE, y/o actividad del INHBE). Dichos medios para medir la inhibición de INHBE pueden comprender un medio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los kits de la invención pueden comprender 5 opcionalmente además medios para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

En determinadas realizaciones, los componentes individuales de la formulación farmacéutica se pueden proporcionar en un recipiente, por ejemplo, un vial o una jeringa precargada.

Alternativamente, puede ser deseable proporcionar los componentes de la formulación farmacéutica 10 por separado en dos o más recipientes, por ejemplo, un recipiente para la preparación de modulador y al menos otro para un compuesto portador. El kit puede empaquetarse en varias configuraciones diferentes, como uno o más contenedores en una sola caja. Los diferentes componentes se pueden combinar, por ejemplo, según las instrucciones proporcionadas con el kit. Los componentes se pueden combinar según un método descrito en el presente documento, por ejemplo, para preparar y 15 administrar una composición farmacéutica. El kit también puede incluir un dispositivo de entrega.

Esta invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitativos. El contenido completo de todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como el listado de secuencias informal y las figuras, 20 se incorporan aquí como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Identificación de la asociación de la pérdida de función de INHBE con la relación 25 cintura-cadera en el biobanco del Reino Unido

La obesidad abdominal es la manifestación más prevalente del síndrome metabólico (Després J. y Lemieux I. *Nature* 2006; 444:881-887) y se reconoce que contribuye a las enfermedades cardiovasculares y al riesgo metabólico más allá del índice de masa corporal (IMC) (Neeland IJ *et al. Alabama. Lancet Diabetes y Endocrinología* 2019; 7(9):715-725). La relación cintura-cadera ajustada 30 por el IMC (WHRadjBMI) refleja la adiposidad abdominal y se correlaciona con las imágenes directas de la grasa abdominal. Los estudios de aleatorización mendeliana han demostrado una relación causal entre WHRadjBMI y el riesgo de diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria junto con accidente cerebrovascular isquémico, rasgos glucémicos y lípidos circulantes (Emdin CA *et al. JAMA* 2017; 317(6):626-634; Dale CE *et al. Circulación* 2017; 135(24):2373-2388).

Se probaron variantes genéticas raras para determinar su asociación con la relación cintura-cadera ajustada al IMC utilizando datos de secuenciación del exoma del Biobanco del Reino Unido (UKBB). UKBB, un gran estudio de biobanco a largo plazo en el Reino Unido (RU), está 35 investigando las contribuciones respectivas de la predisposición genética y la exposición ambiental (incluyendo nutrición, estilo de vida, medicamentos, etc.) al desarrollo de enfermedades (ver, *por ejemplo*, www.ukbiobank.ac.uk). El estudio está siguiendo a unos 500.000 voluntarios en el Reino 40

Unido, inscritos con edades comprendidas entre 40 y 69 años. La inscripción inicial se llevó a cabo durante cuatro años a partir de 2006, y los voluntarios serán seguidos durante al menos 30 años a partir de entonces. Se ha recopilado una gran cantidad de datos fenotípicos, incluidas medidas antropométricas como la circunferencia de la cintura y la cadera. Recientemente, se han obtenido

5 datos de secuenciación del exoma (o la porción de los genomas compuesta por exones) de unos 450.000 participantes en el estudio.

Estas secuencias completas del exoma se utilizaron para identificar variantes raras de pérdida de función prevista (pLOF) (es decir, variantes de cambio de marco, ganancia de parada, donante de empalme o aceptor de empalme) denominadas de alta confianza por LOFTEE. El IMC adj WHR se

10 calculó para los participantes mediante mediciones manuales de la circunferencia de la cintura, la circunferencia de la cadera y el índice de masa corporal (IMC) que se tomaron en su evaluación UKBB. WHR se calculó como la relación de estas dos mediciones. Utilizando estos datos, junto con la edad de reclutamiento y el sexo, se construyó un modelo lineal que modela el WHR ($\text{WHR} \sim \text{Edad} + \text{Sexo} + \text{IMC}$). WHR adjBMI se definió utilizando los residuos de este modelo.

15 Pruebas de colapso basadas en genes (es decir, pruebas de carga) fueron usadas para buscar asociaciones entre variantes raras de pLOF (frecuencia de alelo menor $\leq 1\%$) y WHRadjBMI. Las pruebas de carga se realizaron en la población blanca no relacionada ($n = 363,973$) ajustando por edad y ascendencia genética mediante 30 componentes principales. INHBE pLOF se asoció con una disminución de 0,22 desviaciones estándar en WHRadjBMI (Tabla A). Se probó la asociación de

20 INHBE con rasgos cuantitativos adicionales y detectamos asociaciones con el peso al nacer, WHR (no ajustado por IMC), triglicéridos y colesterol HDL (Tabla A). INHBE pLOF también tiene un índice de probabilidades más bajo para hipertensión, enfermedad coronaria y diabetes tipo 2 (Tabla B)

La variante INHBE pLOF más común en los datos de secuenciación del exoma de UKBB fue una variante aceptora de empalme (rs150777893) portada por 536 de 620 portadores de pLOF.

25 Probado como una variante única, rs150777893 se asoció significativamente con una disminución del IMC de WHRadj (Tabla C).

Tabla A: Asociación de INHBE pLOF con WHRadj BMI y otros rasgos

	Conjunto de variantes	pvalor	Efecto (DE)	N portador medido
RelaciónCinturaCaderaAdjBMI	INHBE pLOF	4.76E-08	-0,22	618
Peso_nacimiento_vida_temprana	INHBE pLOF	7.01E-07	0,26	345
Proporcióncinturacadera	INHBE pLOF	3.45E-05	-0,13	619
Sangre_Bioquímica_Triglicéridos	INHBE pLOF	0.001	-0,13	594
Sangre_Bioquímica_HDL_colesterol	INHBE pLOF	0,01	0,10	550

Tabla B: Asociación de INHBE pLOF con hipertensión, enfermedades cardíacas y diabetes tipo 2

fenotipo	valor p	Rango de probabilidades (IC del 95%)	n casos de portadores	n esperado
I10_hipertensión primaria esencial	0,10	0,86 (0,71, 1,03)	186	202.31
I25_enfermedad isquémica crónica del corazón	0,21	0,83 (0,63, 1,11)	56	61.31
E11_diabetes no dependiente de insulina	0,36	0,87 (0,64, 1,18)	45	50.30

Tabla C: Asociación de la variante del aceptador de empalme rs150777893 con WHRadjBMI

	cromo	posición	ref	alt	valor p	Efecto (SD)	rsid	gen	consecuencia	MAF blanco	N portadores blancos
WHRadjBMI	12	57456093	GRAMO	C	3.75E-08	-0,24	rs150777893	INHBE	variante del aceptador de empalme	0,07%	539

Ejemplo 2. Síntesis de ARNi

5 Fuente de reactivos

Cuando la fuente de un reactivo no se proporciona específicamente en el presente documento, dicho reactivo se puede obtener de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular con un estándar de calidad/pureza para su aplicación en biología molecular.

10 Diseño de ARNi

Los ARNi dirigidos al gen de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE, humano: NCBI refseqID NM_031479.5, NCBI Gene ID: 83729) se diseñaron utilizando scripts personalizados de R y Python. El ARNm humano NM_031479.5 tiene una longitud de 2460 bases.

En la Tabla 2 se muestran listas detalladas de las secuencias de nucleótidos de las cadenas sentido y antisentido de INHBE no modificadas. En la Tabla 3 se muestran listas detalladas de las secuencias de nucleótidos de las cadenas sentido y antisentido de INHBE modificadas.

Debe entenderse que, en toda la solicitud, un nombre de dúplex sin decimal es equivalente a un nombre de dúplex con un decimal que simplemente hace referencia al número de lote del dúplex. Por ejemplo, AD-959917 es equivalente a AD-959917.1.

Síntesis de ARNip

Los ARNip se diseñaron, sintetizaron y prepararon utilizando métodos conocidos en la técnica.

Brevemente, se sintetizaron secuencias de ARNip en una escala de 1 μ mol utilizando un sintetizador Mermade 192 (BioAutomation) con química de fosforamidita sobre soportes sólidos. El soporte sólido era vidrio de poro controlado (500-1000 Å) cargado con un ligando GalNAc personalizado (conjugados 3'-GalNAc), soporte sólido universal (AM Chemicals) o el primer nucleótido de interés. Los reactivos de síntesis auxiliares y los monómeros de fosforamidita de 2-cianoetil estándar (2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, ARN, ADN) se obtuvieron de Thermo-Fisher (Milwaukee, WI), Hongene (China) o Chemgenes (Wilmington, MA, EE. UU.). Se adquirieron monómeros de fosforamidita adicionales de proveedores comerciales, se prepararon internamente o se adquirieron mediante síntesis personalizada de varios CMO. Las fosforamiditas se prepararon a una concentración de 100 mM en acetonitrilo o acetonitrilo:DMF 9:1 y se acoplaron usando 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT, 0,25 M en acetonitrilo) con un tiempo de reacción de 400 s. Los enlaces fosforotioato se generaron usando una solución 100 mM de 3-((Dimetilamino-metiliden)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (DDTT, obtenida de Chemgenes (Wilmington, MA, EE. UU.)) en agua anhidra. acetonitrilo/piridina (9:1 v/v). El tiempo de oxidación fue de 5 minutos. Todas las secuencias se sintetizaron con la eliminación final del grupo DMT ("DMT-Off").

Una vez completada la síntesis en fase sólida, los oligorribonucleótidos soportados en sólidos se trataron con 300 μ l de metilamina (40 % acuoso) a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos durante aproximadamente 2 horas para lograr la escisión del soporte sólido y la posterior eliminación de todas las bases adicionales. grupos protectores lábiles. Para las secuencias que contienen enlaces de ribonucleótidos naturales (2'-OH) protegidos con un grupo terc-butildimetilsililo (TBDMS), se realizó un segundo paso de desprotección usando TEA.3HF (trihidrofluoruro de trietilamina). A cada solución de oligonucleótido en metilamina acuosa se le añadieron 200 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y 300 μ l de TEA.3HF y la solución se incubó durante aproximadamente 30 minutos a 60 °C. Después de la incubación, se dejó que la placa alcanzara temperatura ambiente y los oligonucleótidos crudos se precipitaron mediante la adición de 1 ml de acetonitrilo:etanol 9:1 o etanol:isopropanol 1:1. Luego las placas se centrifugaron a 4 °C durante 45 minutos y el sobrenadante se decantó cuidadosamente con ayuda de una pipeta multicanal. El sedimento de oligonucleótido se resuspendió en NaOAc 20 mM y posteriormente se desalinó utilizando una columna de exclusión de tamaño HiTrap (5 ml, GE Healthcare) en un sistema LC Agilent equipado con un muestreador automático, un detector de UV, un medidor de conductividad y un recolector de fracciones. Las muestras desaladas se recogieron en placas de 96 pocillos y luego se analizaron mediante LC-MS y espectrometría UV para confirmar la identidad y cuantificar la cantidad de material, respectivamente.

La duplexación de cadenas individuales se realizó en un robot de manipulación de líquidos Tecan. Se combinaron cadenas individuales sentido y antisentido en una proporción equimolar hasta una concentración final de 10 μ M en 1x PBS en placas de 96 pocillos, se selló la placa, se incubó a 100 °C durante 10 minutos y posteriormente se dejó regresar lentamente a temperatura ambiente

durante un período de tiempo. período de 2-3 horas. La concentración y la identidad de cada dúplex se confirmaron y luego se utilizaron posteriormente para ensayos de detección in vitro.

Ejemplo 3. Métodos de detección de ARNip in vitro

5 Cultivo celular y transfecciones de 384 pocillos.

Se cultivan células Hep3b (ATCC, Manassas, VA) hasta casi la confluencia a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en medio esencial mínimo de Eagle (Gibco) suplementado con 10% de FBS (ATCC) antes de liberarse de la placa mediante tripsinización. La transfección se lleva a cabo añadiendo 7,5 µl de Opti-MEM más 0,1 µl de Lipofectamine RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. n° de catálogo 13778-150) a 2,5 µl de cada dúplex de ARNip en un pocillo individual en una placa de 384 pocillos. Luego la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se añaden a la mezcla de ARNip cuarenta µl de medio de crecimiento completo sin antibiótico que contiene $\sim 1,5 \times 10^4$ células. Las células se incuban durante 24 horas antes de la purificación del ARN. Los experimentos de dosis única se realizan a una concentración dúplex final de 10 nM, 1 nM y 0,1 nM.

Aislamiento de ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen™, n.º de pieza: 610-12)

Las células se lisan en 75 µl de tampón de lisis/unión que contiene 3 µl de perlas por pocillo y se mezclan durante 10 minutos en un agitador electrostático. Los pasos de lavado se automatizan en un Biotek EL406, utilizando un soporte de placa magnética. Las perlas se lavan (en 90 µlitros) una vez en Tampón A, una vez en Tampón B y dos veces en Tampón E, con pasos de aspiración intermedios. Después de una aspiración final, se añaden 10 litros de mezcla RT completa a cada pocillo, como se describe a continuación.

Síntesis de ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813)

Se añade por pocillo una mezcla maestra de 1 µl de tampón 10X, 0,4 µl de dNTP 25X, 1 µl de cebadores aleatorios, 0,5 µl de transcriptasa inversa, 0,5 µl de inhibidor de RNasa y 6,6 µl de H₂O por reacción. Las placas se sellan, se agitan durante 10 minutos en un agitador electrostático y luego se incuban a 37 grados C durante 2 horas. A continuación, las placas se agitan a 80 grados C durante 8 minutos.

PCR en tiempo real

Se añaden dos microlitros (µl) de ADNc a una mezcla maestra que contiene 0,5 µl de sonda GAPDH TaqMan humana (4326317E), 0,5 µl de INHBE humano, 2 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl de mezcla maestra de sonda Lightcycler 480. (Roche Cat # 04887301001) por pocillo en placas de

384 pocillos (Roche cat # 04887301001). La PCR en tiempo real se realiza en un sistema de PCR en tiempo real LightCycler480 (Roche).

Para calcular el cambio relativo, los datos se analizan utilizando el método $\Delta\Delta C_t$ y se normalizan con ensayos realizados con células transfectadas con AD-1955 10 nM o células transfectadas simuladas. Los IC50 se calculan utilizando un modelo de ajuste de 4 parámetros usando XLFit y se normalizan para células transfectadas con AD-1955 o transfectadas de forma simulada. Las secuencias sentido y antisentido de AD-1955 son: sentido: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT y antisentido UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT.

10 **Ejemplo 4. Síntesis del agente polinucleótido antisentido**

Bioinformática

Se diseñó y sintetizó un conjunto de agentes polinucleotídicos antisentido dirigidos al gen de la subunidad beta E de la inhibina (INHBE, humano: NCBI refseqID NM_031479.5, NCBI Gene ID: 83729) usando métodos de síntesis estándar bien conocidos en la técnica.

15 En la Tabla 4 se muestra una lista detallada de las secuencias de nucleótidos no modificadas de moléculas antisentido dirigidas a INHBE y en la Tabla 5 se muestra una lista detallada de las secuencias de nucleótidos modificadas de moléculas antisentido dirigidas a INHBE.

Ejemplo 5. Ensayo de detección de ADN ramificado (ADNb) basado en fluorescencia *In vitro*

20 *Resumen*

Se analizó la expresión de INHBE en un panel de 32 líneas celulares humanas midiendo el nivel de transcrito de INHBE utilizando un ensayo de ADN ramificado (ADNb) basado en fluorescencia. Se identificó una línea celular (Hep3B) con expresión suficiente (al menos 50 veces por encima de las unidades de luminiscencia relativa (RLU) de fondo) como modelo *in vitro* para detectar ARNpi y ASO de INHBE para detectar la eliminación de la diana.

Materiales y métodos

Se diseñaron conjuntos de sondas Quantigene para ARNm de INHBE humano y GapDH humano (gen ama de llaves para la normalización) y para Ahsa1, que se utilizó como control positivo en las pruebas de detección. Los oligos Probeset se encargaron a ThermoFisher Scientific y los sintetizaron Metabion. Secuencias de Probeset, sin sus partes propietarias, para INHBE, GapdDH y Ahsa1.

35 Para identificar una línea celular con suficiente expresión diana para la detección (RLU al menos ~50 veces por encima del fondo), se analizaron lisados de 32 líneas celulares humanas para determinar la expresión diana de INHBE mediante el ensayo Quantigene Singleplex. De cada línea celular, se analizaron dos volúmenes diferentes de lisado con una concentración de 200.000 células/ml de lisado. El ensayo Quantigene se realizó según el protocolo del fabricante de Quantigene Singleplex. La luminiscencia se leyó utilizando el contador de luminiscencia 1420 (WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Alemania) después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad.

Detección in vitro y respuesta a la dosis en células Hep3B

Se cultivan células Hep3b (ATCC, Manassas, VA) hasta casi la confluencia a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en medio esencial mínimo de Eagle (Gibco) suplementado con 10% de FBS (ATCC) antes de liberarse de la placa mediante tripsinización.

Para la transfección de células Hep3B, se sembraron células a una densidad de 15.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (#655180, GBO, Alemania). La transfección de ARNip se llevó a cabo con Lipofectamine RNAiMax, los oligonucleótidos antisentido (ASO) se transfectaron con Lipofectamine 2000 (ambos de Invitrogen/Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la transfección inversa. La selección *in vitro* se realizó con ARNip/ASO por cuadruplicado a 10 nM y 1 nM, con ARNip dirigidos a Ahsa1, Firefly-Luciferase y Renilla-Luciferase como controles inespecíficos y una transfección simulada. Después de 24 horas de incubación con ARNip/ASO, se eliminó el medio y las células se lisaron en 150 µl de mezcla de lisis de medio (1 volumen de tampón de lisis, 2 volúmenes de medio de cultivo celular) y luego se incubaron a 53 °C durante 30 minutos. El ensayo de ADNb se realizó según las instrucciones del fabricante con un conjunto de sondas dirigidas a INHBE humano. La luminiscencia se leyó utilizando el contador de luminiscencia 1420 (WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Alemania) después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad.

El ARNip de Ahsa1 sirvió como control inespecífico para la expresión del ARNm diana de INHBE y como control positivo para la eficiencia de la transfección con respecto al nivel de ARNm de Ahsa1. Mediante la hibridación con un conjunto de sondas Ahsa1, la transfección simulada sirvió como control para el nivel de ARNm de Ahsa1. La eficiencia de transfección para cada placa de 96 pocillos y ambas dosis en la selección de dosis *in vitro* se calculó relacionando el nivel de Ahsa1 en células tratadas con ARNip/ASO de Ahsa1 (normalizado a GapDH) con los niveles de Ahsa1 en células tratadas de forma simulada.

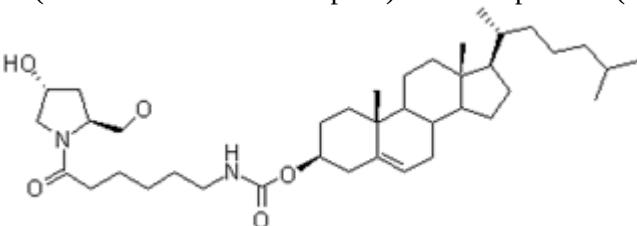
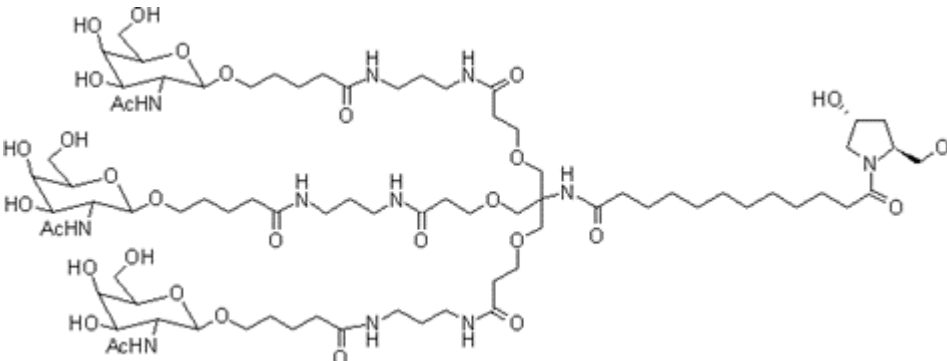
Para cada pocillo, el nivel de ARNm diana se normalizó al nivel de ARNm de GapDH respectivo. La actividad de un ARNip/ASO determinado se expresó como porcentaje de la concentración de ARNm de la diana respectiva (normalizada a ARNm de GapDH) en las células tratadas, en relación con la concentración de ARNm diana (normalizada a ARNm de GapDH) promediada en los pocillos de control o en los pocillos transfectados simulados (República Democrática del Congo). La concentración inhibidora media máxima (IC₅₀) se determinó con el software XLfit (un complemento de Excel) usando un modelo logístico de 4 parámetros con la fórmula $Y = \text{fondo} + (\text{superficie} - \text{fondo}) / (1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{X}\right)^{\text{Ladera}})$ y con Superficie restringido a un valor del 100%. La IC₈₀ (concentración inhibidora del 80 %) se calculó a partir de la IC₅₀ utilizando la fórmula $\text{IC}_F = \left(\frac{F}{100-F}\right)^{\frac{1}{H}} \times \text{IC}_{50}$, donde F es el porcentaje de inhibición y H es la pendiente de la colina.

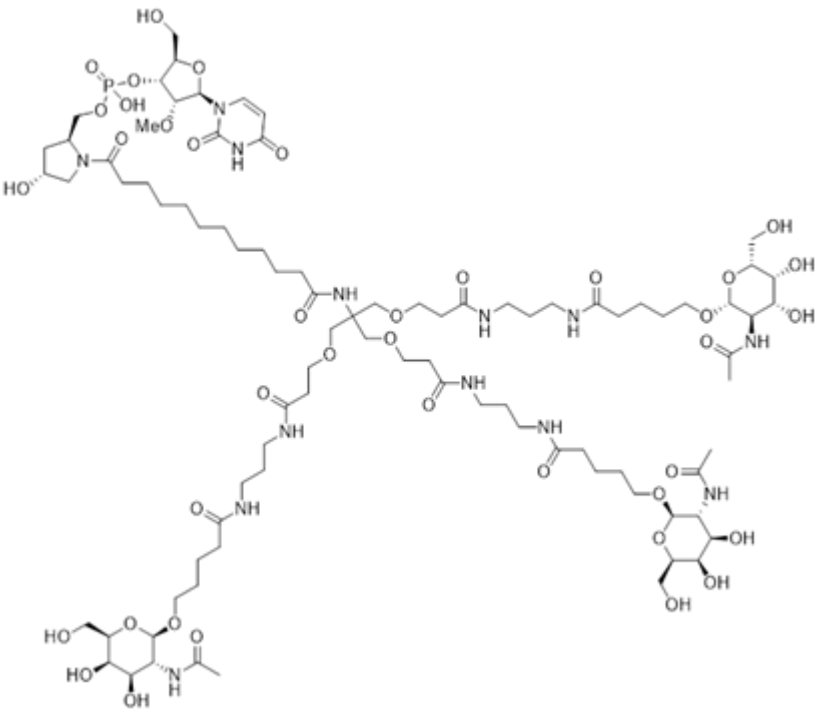
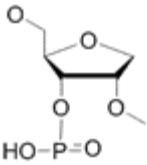
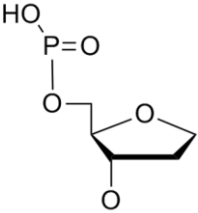
La Tabla 6 muestra los resultados del cribado *in vitro* en células transfectadas con las moléculas antisentido indicadas.

Tabla 1. Abreviaturas de monómeros de nucleótidos utilizados en la representación de

secuencias de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están unidos entre sí mediante enlaces 5'-3'-fosfodiéster; y se entiende que cuando el nucleótido contiene una modificación 2'-fluoro, entonces el fluoro reemplaza al hidroxilo en esa posición en el nucleótido original (es decir, es un 2'-desoxi-2'-fluoronucleótido). Debe entenderse además que las abreviaturas de nucleótidos en la tabla omiten el 3'-fosfato (es decir, son 3'-OH) cuando se colocan en la posición 3'-terminal de un oligonucleótido.

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Ab	beta-L-adenosina-3'-fosfato
Abs	beta-L-adenosina-3'-fosforotioato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cb	beta-L-citidina-3'-fosfato
Cbs	beta-L-citidina-3'-fosforotioato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gb	beta-L-guanosina-3'-fosfato
Gbs	beta-L-guanosina-3'-fosforotioato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3'-fosforotioato
U	uridina-3'-fosfato
Uf	2'-fluorouridina-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridina-3'-fosforotioato
Us	uridina-3'-fosforotioato
N	cualquier nucleótido, modificado o no modificado
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3'-fosforotioato
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
cs	Fosforotioato de 2'-O-metilcitidina-3'-
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3'-fosforotioato
t	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosfato
ts	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosforotioato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
us	2'-O-metiluridina-3'-fosforotioato
s	enlace fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
L10	N-(colestonilcarboxamidocaproil)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6-Col) 
L96	N-[tris(GalNAc-alkil)-amidodecanoil]-4-hidroxirolinol (Hip-(GalNAc-alkil)3) (2S,4R)-1-[29-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-14,14-bis[[3-[[3-[[5-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-1-oxopentil]amino]propil]amino]-3-oxopropoxi]metil]-1,12,19,25-tetraoxo-16-oxa-13,20,24-triazanonacos-1-il]-4-hidroxi-2-hidroxiometilpirrolidina 

Abreviatura	Nucleótido(s)
uL96	2'-O-metiluridina-3'-fosfato ((2S,4R)-1-[29-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-14,14-bis[[3-[[3-[[5-[[2-(acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranosil]oxi]-1-oxopentil]amino]propil]amino]-3-oxopropoxi]metil]-Éster de 1,12,19,25-tetraoxo-16-oxa-13,20,24-triazanonacos-1-il]-4-hidroxi-2-pirrolidinil)metílico 
Y34	2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosfato (2'-OMe furanosa básica) 
Y44	ADN abásico invertido (2-hidroximetil-tetrahidrofurano-5-fosfato) 
(Agn)	Ácido nucleico adenosina-glicol (GNA)
(CGN)	Ácido nucleico citidina-glicol (GNA)
(Ggn)	Ácido nucleico guanosina-glicol (GNA)
(Tgn)	Isómero S del ácido nucleico de timidina-glicol (GNA)
P	Fosfato
VP	vinilfosfonato
dA	2'-desoxiadenosina-3'-fosfato
dAs	2'-desoxiadenosina-3'-fosforotioato
dC	2'-desoxicitidina-3'-fosfato
dCs	2'-desoxicitidina-3'-fosforotioato
dG	2'-desoxiguanosina-3'-fosfato
dGs	2'-desoxiguanosina-3'-fosforotioato
dT	2'-desoxitimidina -3'-fosfato

Abbreviatura	Nucleótido(s)
dTs	2`-desoxitimidina-3`-fosforotioato
dU	2`-desoxiuridina
dUs	2`-desoxiuridina-3`-fosforotioato
(C2p)	citidina-2`-fosfato
(G2p)	guanosina-2`-fosfato
(U2p)	uridina-2`-fosfato
(A2p)	adenosina-2`-fosfato
(Ahd)	2'-O-hexadecil-adenosina-3'-fosfato
(Ahds)	2'-O-hexadecil-adenosina-3'-fosforotioato
(Chd)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosfato
(Chds)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosforotioato
(Ghd)	2'-O-hexadecil-guanosina-3'-fosfato
(Ghds)	2'-O-hexadecil-guanosina-3'-fosforotioato
(Uhd)	2'-O-hexadecil-uridina-3'-fosfato
(Uhds)	2'-O-hexadecil-uridina-3'-fosforotioato
(Aeo)	2`-O-metoxietiladenosina-3`-fosfato
(Aeos)	2`-O-metoxietiladenosina-3`-fosforotioato
(Geo)	2`-O-metoxietilguanosina-3`-fosfato
(Geos)	2`-O-metoxietilguanosina-3`-fosforotioato
(Teo)	2`-O-metoxietil-5-metiluridina-3`-fosfato
(Teos)	2`-O-metoxietil-5-metiluridina-3`-fosforotioato
(m5Ceo)	2`-O-metoxietil-5-metilcitidina-3`-fosfato
(m5Ceos)	2`-O-metoxietil-5-metilcitidina-3`-fosforotioato
(m5dC)	5'-metil-desoxicitidina-3`-fosfato
(m5dCs)	5'-metil-desoxicitidina-3`-fosforotioato

Tabla 2. Secuencias de cadenas sentido y antisentido no modificadas de agentes de ARNbc de INHBE

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en ARNm de INHBE NM_031479.5	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1656008	UAGCCAGACAUGAGCUGUGAU		1-23	AUCACAGCUCAUGUCUGGCUACU	
AD-1656026	GAGGGUCAAGCACAGCUAUCU		19-41	AGAUAGCUGUGCUUGACCCUCAC	
AD-1656043	AUCCAUCAGAUGAUCUACUUU		36-58	AAAGUAGAUAUCUGAUGGAUAG	
AD-1656054	GAUCUACUUUCAGCCUCCUU		47-69	AAGGAAGGCUGAAAGUAGAUAU	
AD-1656074	GAGUCCCAGACAAUAGAAGAU		67-89	AUCUUCUAUUGUCUGGGACUCAG	
AD-1656086	AUAGAAGACAGGUGGCUGUAU		79-101	AUACAGCCACCUGUCUUCUAUUG	
AD-1656097	GUGGCUGUACCCUUGGCCAAU		90-112	AUUGGCCAAGGGUACAGCCACCU	
AD-1656108	CUUGGCCAAGGGUAGGUGUGU		101-123	ACACACCUACCCUUGGCCAAGGG	
AD-1656125	GUGGCAGUGGUGUCUGCUGUU		118-140	AACAGCAGACACCACUGCCACAC	
AD-1656139	UGCUGUCACUGUGCCCUCAUU		132-154	AAUGAGGGCACAGUGACAGCAGA	
AD-1656146	AGCAAUCAGACUCAACAGACU		160-182	AGUCUGUUGAGUCUGAUUGCUGG	
AD-1656164	ACGGAGCAACUGCCAUCCGAU		178-200	AUCGGAUGGCAGUUGCUCGUCU	
AD-1656185	GCUCCUGAACCAGGGCCAUUU		199-221	AAAUGGCCCUGGUUCAGGAGCCU	
AD-1656196	AGGGCCAUUCACCAGGAGCAU		210-232	AUGCUCUGGUGAAUGGCCCUGG	
AD-1656220	GCUCCUGAUGUCCAGCUCUU		234-256	AAGAGCUGGACAUCAGGGAGCCG	
AD-1656233	CAGCUCUGGCUGGUGCUGCUU		247-269	AAGCAGCACCAGCCAGAGCUGGA	
AD-1656254	UGGGCACUGGUGCGAGCACAU		268-290	AUGUGCUCGCACCAGUGCCCACA	
AD-1656260	AGGGUCUGUGUGUCCCUCCUU		294-316	AAGGAGGGACACACAGACCCUGU	
AD-1656265	CAAGCAGAACGAGCUCUGGUU		337-359	AACCAGAGCUCGUUCUGCUUGGG	
AD-1656280	CUGGUGCUGGAGCUAGCCAAU		352-374	AUUGGCUAGCUCCAGCACCAGAG	
AD-1656292	CUAGCCAAGCAGCAAUCCUU		364-386	AAGGAUUUGCUGCUUGGCUAGCU	
AD-1656307	AUCCUGGAUGGGUUGCACCUU		379-401	AAGGUGCAACCCAUCCAGGAUUU	
AD-1656319	UUGCACCUGACCAGUCGUCCU		391-413	AGGACGACUGGUCAGGUGCAACC	
AD-1656333	UCGUCCCAGAAUAACUCAUCU		405-427	AGAUGAGUUAUUCUGGGACGACU	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en ARNm de INHBE NM_031479.5	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1656360	CCCUCCGGAGACUACAGCCAU		452-474	AUGGCUGUAGUCUCCGGAGGGCU	
AD-1656372	UACAGCCAGGGAGUGUGGCUU		464-486	AAGCCACACUCCUGGCUGUAGU	
AD-1656383	AGUGUGGCUCAGGGAAUGGU		475-497	ACCAUUCCUGGAGCCACACUCC	
AD-1656392	CAUCAGCUUUGCUACUGUCAU		504-526	AUGACAGUAGCAAAGCUGAUGAC	
AD-1656406	CUGUCACAGACUCCACUUCAU		518-540	AUGAAGUGGAGUCUGUGACAGUA	
AD-1656417	UCCACUUCAGCCUACAGCUCU		529-551	AGAGCUGUAGGCUGAAGUGGAGU	
AD-1656437	CCUGCUCACUUUUCACCUGUU		549-571	AACAGGUGAAAAGUGAGCAGGGA	
AD-1656449	UCACCUGUCCACUCCUCGGUU		561-583	AACCGAGGAGUGGACAGGUGAAA	
AD-1656468	UCCCACCACCUGUACCAUGCU		580-602	AGCAUGGUACAGGUGGUGGGACC	
AD-1656480	UACCAUGCCCGCCUGUGGCUU		592-614	AAGCCACAGGCGGGCAUGGUACA	
AD-1656492	CCCUUCCUGGCACUCUUUGCU		626-648	AGCAAAGAGUGCCAGGAAGGGUG	
AD-1656504	CUCUUUGCUUGAGGAUCUUCU		638-660	AGAAGAUCCUCAAGCAAAGAGUG	
AD-1656535	ACUCUCCUGGCUGAGCACCAU		694-716	AUGGUGCUCAGCCAGGAGAGUGC	
AD-1656547	GAGCACCACAUCACCAACCUU		706-728	AAGGUUGGUGAUGUGGUGCUCAG	
AD-1656559	ACCAACCUGGGCUGGCAUACU		718-740	AGUAUGCCAGCCCAGGUUGGUGA	
AD-1656570	CUGGCAUACCUUAACUCUGCU		729-751	AGCAGAGUUAAGGUAUGCCAGCC	
AD-1656587	UGCCCUAGUGGCUUGAGGU		746-768	ACCUCAAGCCACUAGAGGGCAGA	
AD-1656591	AGAAGUCUGGUGUCCUGAAAU		770-792	AUUUCAGGACACCAGACUUCUCA	
AD-1656602	GUCCUGAAACUGCAACUAGAU		781-803	AUCUAGUUGCAGUUUCAGGACAC	
AD-1656622	ACAGCACAGUUACUGGACAAU		821-843	AUUGUCCAGUAACUGUGCUGUUG	
AD-1656634	CUGGACAACCGAGGCGGCUCU		833-855	AGAGCCGCCUCGGUUGUCCAGUA	
AD-1656647	GCGGCUCUUGGACACAGCAGU		846-868	ACUGCUGUGUCCAAGAGCCGCCU	
AD-1656667	GACACCAGCAGCCCUUCCUAU		866-888	AUAGGAAGGGCUGCUGGUGUCCU	
AD-1656679	CCUUCCUAGAGCUUAAGAUCU		878-900	AGAUCUUAAGCUCUAGGAAGGGC	
AD-1656690	CUUAAGAUCGAGCCAAUGAU		889-911	AUCAUUGGCUCGGAUCUUAAGCU	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en ARNm de INHBE NM_031479.5	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1656701	AGCCAAUGAGCCUGGAGCAGU		900-922	ACUGCUCCAGGCUCAUUGGCUCG	
AD-1656716	AGGCGAGACCAUACGUAGAU		973-995	AUCUACGUAAUGGUCUCGCCUCG	
AD-1656728	UACGUAGACUCCAGGAACUU		985-1007	AAGUUCUGGAAGUCUACGUAAU	
AD-1656740	CAGGAACUGGGAUGGCGGGAU		997-1019	AUCCCGCCAUCCAGUCCUGGA	
AD-1656754	GCGGGACUGGAUACUGCAGCU		1011-1033	AGCUGCAGUAUCCAGUCCCGCCA	
AD-1656762	UACCAGCUGAAUACUGCAGU		1039-1061	ACUGCAGUAAUUCAGCUGGUACC	
AD-1656775	ACUGCAGUGGGCAGUGCCCUU		1052-1074	AAGGGCACUGCCCACUGCAGUAA	
AD-1656792	CAGGCAUUGCUGCCUCUUUCU		1091-1113	AGAAAGAGGCAGCAAUGCCUGGG	
AD-1656808	UUUCCAUUCUGCCGUCUUAU		1107-1129	AUGAAGACGGCAGAAUGGAAAGA	
AD-1656820	CGUCUUCAGCCUCCUCAAAGU		1119-1141	ACUUUGAGGAGGCUGAAGACGGC	
AD-1656832	CCUCAAGCCAACAAUCCUUU		1131-1153	AAAGGAUUGUUGGCUUUGAGGAG	
AD-1656849	CUUGGCCUGCCAGUACCUCCU		1148-1170	AGGAGGUACUGGCAGGCCAAGGA	
AD-1656862	UACCUCUGUUGUGUCCCUAU		1161-1183	AUAGGGACACAACAGGAGGUACU	
AD-1656873	GUGUCCCUACUGCCCGAAGGU		1172-1194	ACCUUCGGGCAGUAGGGACACAA	
AD-1656876	CUCUCUCUCCUCUACCUGGAU		1195-1217	AUCCAGGUAGAGGAGAGAGAGGG	
AD-1656888	UACCUGGAUCAUAAUGGCAAU		1207-1229	AUUGCCAUAUGAUCCAGGUAGA	
AD-1656900	AAUGGCAAUGUGGUCAAGACU		1219-1241	AGUCUUGACCACAUUGCCAUAU	
AD-1656915	AAGACGGAUGUGCCAGAUAAU		1234-1256	AAUAUCUGGCACAUCCGUCUUGA	
AD-1656926	GCCAGAU AUGGUGGUGGAGGU		1245-1267	ACCUCCACCACCAUAUCUGGCAC	
AD-1656942	GAGGCCUGUGGCUGCAGCUAU		1261-1283	AUAGCUGCAGCCACAGGCCUCCA	
AD-1656954	UGCAGCUAGCAAGAGGACCUU		1273-1295	AAGGUCCUCUUGCUAGCUGCAGC	
AD-1656958	CUUUGGAGUGAAGAGACCAAU		1297-1319	AUUGGUCUCUUCACUCCAAAGCC	
AD-1656969	AGAGACCAAGAUGAAGUUUCU		1308-1330	AGAAACUUCAUCUUGGUCUCUUC	
AD-1656996	CAGGGCAUCUGUGACUGGAGU		1335-1357	ACUCCAGUCACAGAUGCCCUGUG	
AD-1657013	GAGGCAUCAGAUUCCUGAUCU		1352-1374	AGAUCAGGAUUCUGAUGCCUCCA	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en ARNm de INHBE NM_031479.5	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1657022	ACCCAACAACCACCUGGCAAU		1381-1403	AUUGCCAGGUGGUUGUUGGGUUG	
AD-1657037	GGCAAUAUGACUCACUUGACU		1396-1418	AGUCAAGUGAGUCAUAUUGCCAG	
AD-1657045	GACCCAAAUGGGCACUUUCUU		1424-1446	AAGAAAGUGCCCAUUUGGGUCCC	
AD-1657058	ACUUUCUUGUCUGAGACUCUU		1437-1459	AAGAGUCUCAGACAAGAAAGUGC	
AD-1657069	UGAGACUCUGGCUUAUUCCAU		1448-1470	AUGGAAUAAGCCAGAGUCUCAGA	
AD-1657085	UCCAGGUUGGCUAUGUGUUU		1464-1486	AAACACAUCAGCCAACCUGGAAU	
AD-1657099	UGUGUUGGGAGAUGGGUAAAU		1478-1500	AUUUACCCAUCUCCCAACACAUC	
AD-1657113	GGUAAAGCGUUUCUUCUAAAU		1492-1514	AUUUAGAAGAAACGCUUUACCCA	
AD-1657119	UACCCAGAAAGCAUGAUUUCU		1518-1540	AGAAAUCAUGC UUUCUGGGUAGA	
AD-1657133	GAUUUCCUGCCCUAAGUCCUU		1532-1554	AAGGACUUAGGGCAGGAAAUCAU	
AD-1657147	AGUCCUGUGAGAAGAUGUCAU		1546-1568	AUGACAUCUUCUCACAGGACUUA	
AD-1657164	UCAGGGACUAGGGAGGGAGGU		1563-1585	ACCUCCCUCCCUAGUCCUGACA	
AD-1657185	AAUUACUUAGCCUCUCCCAAU		1600-1622	AUUGGGAGAGGCUAAGUAAUUUU	
AD-1657202	CAAGAUGAGAAAGUCCUCAAU		1617-1639	AUUGAGGACUUUCUCAUCUUGGG	
AD-1657211	GGAGGAAGCAGAUAGAUGGUU		1646-1668	AACCAUCUAUCUGCUUCCUCCUC	
AD-1657234	GCAGGCUUGAAGCAGGGUAAU		1669-1691	AUUACCCUGCUUCAAGCCUGCUG	
AD-1657245	GCAGGGUAAGCAGGCUGGCCU		1680-1702	AGGCCAGCCUGCUUACCCUGCUU	
AD-1657261	GGCCCAGGGUAAGGGCUGUUU		1696-1718	AAACAGCCCUUACCCUGGGCCAG	
AD-1657274	GGCUGUUGAGGUACCUUAAGU		1709-1731	ACUUAAGGUACCUCAACAGCCCU	
AD-1657286	ACCUUAAGGGAAGGUCAAGAU		1721-1743	AUCUUGACCUUCCCUUAAGGUAC	
AD-1657299	GUCAAGAGGGAGAUGGGCAAU		1734-1756	AUUGCCCAUCUCCCUUCUUGACCU	
AD-1657322	GCUGAGGGAGGAUGCUUAGGU		1757-1779	ACCUAAGCAUCCUCCUCAGCGC	
AD-1657324	AGAAACAGGAGUCAGGAAAAU		1785-1807	AUUUUCUGACUCCUGUUUCUGG	
AD-1657335	UCAGGAAAAUGAGGCACUAAU		1796-1818	AUUAGUGCCUCAUUUCCUGACU	
AD-1657347	GGCACUAAGCCUAAGAAGUUU		1808-1830	AAACUUCUUAGGCUUAGUGCCUC	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en ARNm de INHBE NM_031479.5	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1657359	AAGAAGUCCCCUGGUUUUUUCU		1820-1842	AGAAAAACCAGGGAACUUCUUAG	
AD-1657374	CACUGGGAGACAAGCAUUUAU		1855-1877	AUAAAUGCUUGUCUCCCAGUGGG	
AD-1657385	AAGCAUUUAUACUUUCUUUCU		1866-1888	AGAAAGAAAGUAUAAAUGCUUGU	
AD-1657395	UUUUGAGAUCGAGUCUCGCUU		1899-1921	AAGCGAGACUCGAUCUCAAAAAA	
AD-1657410	UCUCGCUCUGUCACCAGGCUU		1912-1934	AAGCCUGGUGACAGAGCGAGACU	
AD-1657431	AGUGCAGUGACACGAUCUUGU		1934-1956	ACAAGAUCGUGUCACUGCACUCC	
AD-1657446	GCUCACUGCAACCUCCGUCUU		1954-1976	AAGACGGAGGUUGCAGUGAGCCA	
AD-1657457	CCUCCGUCUCCUGGGUUCAAU		1965-1987	AUUGAACCCAGGAGACGGAGGUU	
AD-1657463	UUCUGCCUCAGCCUCCCGAGU		1992-2014	ACUCGGGAGGCUGAGGCAGAAGA	
AD-1657475	UGGGUUCAAGUGAUUCUUCUU		1976-1998	AAGAAGAAUCACUUGAACCCAGG	
AD-1657503	GAGCAGCUGGGAUUACAGGCU		2009-2031	AGCCUGUAAUCCAGCUGCUCGG	
AD-1657520	CGCCACUAAUUUUUGUAUUU		2028-2050	AAAUACAAAAAUUAGUGGGCGCC	
AD-1657529	UGUAUUCUUAGUAGAAACGAU		2042-2064	AUCGUUUCUACUAAGAAUACAAA	
AD-1657540	UAGAAACGAGGUUUCACAAU		2053-2075	AAUGUUGAAACCUCGUUUCUACU	
AD-1657552	UUCAACAUGUUGGCCAGGAUU		2065-2087	AAUCCUGGCCAACAUGUUGAAAC	
AD-1657564	CCAGGAUGGUCUCAAUCUCUU		2078-2100	AAGAGAUUGAGACCAUCCUGGCC	
AD-1657575	UCAAUCUCUUGACCUCUUGAU		2089-2111	AUCAAGAGGUCAAGAGAUUGAGA	
AD-1657586	ACCUCUUGAUCCACCCGACUU		2100-2122	AAGUCGGGUGGAUCAAGAGGUCA	
AD-1657600	CCGACUUGGCCUCCCGAAGUU		2114-2136	AACUUCGGGAGGCCAAGUCGGGU	
AD-1657615	GAAGUGAUGAGAUUAUAGGCU		2129-2151	AGCCUAUAAUCUCAUCACUUCGG	
AD-1657641	CCUGGCUUAUACUUUCUUAU		2162-2184	AUUAAGAAAGUAUAAGCCAGGCG	
AD-1657653	GAGAAAGAAAAUCAACAAAUU		2189-2211	AAUUUGUUGAUUUUCUUCUCCU	
AD-1657674	UGAGUCAUAAAGAAGGGUUAU		2210-2232	AUAACCCUUCUUUAUGACUCACA	
AD-1657687	AGGGUUAGGGUGAUGGUCCAU		2223-2245	AUGGACCAUCACCCUAACCCUUC	
AD-1657704	CCAGAGCAACAGUUCUUCAAU		2240-2262	AUUGAAGAACUGUUGCUCUGGAC	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en ARNm de INHBE NM_031479.5	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1657716	UUCUUCAAGUGUACUCUGUAU		2252-2274	AUACAGAGUACACUUGAAGAACU	
AD-1657727	UACUCUGUAGGCUUCUGGGAU		2263-2285	AUCCCAGAAGCCUACAGAGUACA	
AD-1657741	CUGGGAGGUCCCUUUUCAGGU		2277-2299	ACCUGAAAAGGGACCUCCAGAA	
AD-1657744	GUCCACAAAGUCAAGCUAUU		2300-2322	AAUAGCUUUGACUUUGUGGACAC	
AD-1657760	CUAACAUGUUAUUUGCCUUUU		2333-2355	AAAAGGCAAAUAACAUGUUAGUA	
AD-1657776	CUUUUGAAUUCUCAUUAUCUU		2349-2371	AAGAUAUUGAGAAUUCAAAAGGC	
AD-1657793	GUUUUGUGGAGUUUCCAGAU		2376-2398	AUCUGGAAAACUCCACAAUACAA	
AD-1657811	GAGGCCGUGUGACAUGUGAUU		2394-2416	AAUCACAUGUCACACGGCCUCUG	
AD-1657822	ACAUGUGAUUACAUCAUUUU		2405-2427	AAAGAUGAUGUAAUCACAUGUCA	
AD-1657834	AUCAUCUUUCUGACAUCAUUU		2417-2439	AAAUGAUGUCAGAAAGAUGAUGU	
AD-1657845	GACAUCAUUGUUAUUGGAAUU		2428-2450	AAUCCAUAUACAAUGAUGUCAG	

Tabla 3. Secuencias de cadenas sentido y antisentido modificadas de agentes de ARNbc de INHBE

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana de ARNm	SEQ ID NO:
AD-1656008	usasgccaGfaCfAfUfgagcugugauL96		asUfscacAfgCfUfcaugUfcUfggcuascsu		AGTAGCCAGACATGAGCTGTGAG	
AD-1656026	gsasggguCfaAfGfCfacagcuauL96		asGfsauaGfcUfGfugcuUfgAfccucasc		GTGAGGGTCAAGCACAGCTATCC	
AD-1656043	asusccauCfaGfAfUfgaucuacuuL96		asAfsaguAfgAfUfcaucUfgAfuggausasg		CTATCCATCAGATGATCTACTTT	
AD-1656054	gsasucuaCfuUfUfCfagccuuccuuL96		asAfsaggAfgGfCfugaaAfgUfagaucasu		ATGATCTACTTTCAGCCTTCCTG	
AD-1656074	gsasguccCfaGfAfCfaauagaagauL96		asUfscuuCfuAfUfugucUfgGfgacucasc		CTGAGTCCCAGACAATAGAAGAC	
AD-1656086	asusagaaGfaCfAfGfguggcugauL96		asUfsacaGfcCfAfcugUfcUfucuausug		CAATAGAAGACAGGTGGCTGTAC	
AD-1656097	gsusggcuGfuAfCfCfcuuggccaauL96		asUfsuggCfcAfAfgggUfAfcAfgccacscsu		AGGTGGCTGTACCCTTGGCCAAG	
AD-1656108	csusggcCfaAfGfGfguagguguguL96		asCfsacaCfcUfAfcuuUfgGfccaagsgsg		CCCTTGGCCAAGGGTAGGTGTGG	
AD-1656125	gsusggcaGfuGfGfUfgucuguguuL96		asAfsagCfaGfAfcaccAfcUfgccacasc		GTGTGGCAGTGGTGTCTGCTGTC	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana de ARNm	SEQ ID NO:
AD-1656139	usgscuguCfaCfUfGfugcccucauuL96		asAfsugaGfgGfCfacagUfgAfcagcasgsa		TCTGCTGTCACTGTGCCCTCATT	
AD-1656146	asgscaauCfaGfAfCfucaacagacuL96		asGfsucuGfuUfGfagucUfgAfuugcusgsg		CCAGCAATCAGACTCAACAGACG	
AD-1656164	ascsggagCfaAfCfUfgccaucgcauL96		asUfscggAfuGfGfcaguUfgCfuccguscsu		AGACGGAGCAACTGCCATCCGAG	
AD-1656185	gscsuccuGfaAfCfCfagggccauuuL96		asAfsaugGfcCfCfugguUfcAfggagcscsu		AGGCTCCTGAACCAGGGCCATTC	
AD-1656196	asgsggccAfuUfCfAfcaggagcauL96		asUfsgcuCfcUfGfgugaAfuGfgccusgsg		CCAGGGCCATTACCAGGAGCAT	
AD-1656220	gscsuccUfgAfUfGfuccagcucuL96		asAfsagCfuGfGfacauCfaGfggagcscsg		CGGCTCCCTGATGTCCAGCTCTG	
AD-1656233	csasgcuCfGfCfUfggugcugcuL96		asAfsagcaGfcAfCfcagcCfaGfagcugsgsa		TCCAGCTCTGGCTGGTGCTGCTG	
AD-1656254	usgsggcaCfuGfGfUfgcgagcacauL96		asUfsgugCfuCfGfcaccAfgUfgcccasca		TGTGGGCACTGGTGCGAGCACAG	
AD-1656260	asgsggucUfgUfGfUfguccuccuuL96		asAfsngaGfgGfAfcacaCfaGfaccusgsu		ACAGGGTCTGTGTGTCCCTCCTG	
AD-1656265	csasagcaGfaAfCfGfagcucugguuL96		asAfsccaGfaGfCfucguUfcUfgcuugsgsg		CCCAAGCAGAACGAGCTCTGGTG	
AD-1656280	csusggugCfuGfGfAfgcuagccaauL96		asUfsuggCfuAfGfcuccAfgCfaccagsasg		CTCTGGTGCTGGAGCTAGCCAAG	
AD-1656292	csusagccAfaGfCfAfgcaaaucuuL96		asAfsngaUfuUfGfcugcUfuGfgcuagscsu		AGTAGCCAAGCAGCAAATCCTG	
AD-1656307	asusccugGfaUfGfGfguugcaccuuL96		asAfsnguGfcAfAfcccaUfcCfaggauusu		AAATCCTGGATGGGTTGCACCTG	
AD-1656319	usugscacCfuGfAfCfcagucgucuL96		asGfsgacGfaCfUfggucAfgGfugcaascsc		GGTTGCACCTGACCAGTCGTCCC	
AD-1656333	uscsguccCfaGfAfAfaacucauL96		asGfsaugAfgUfUfauucUfgGfgacgascu		AGTCGTCCCAGAATAACTCATCC	
AD-1656360	cscsuccGfgAfGfAfcuacagccauL96		asUfsggcUfgUfAfgucuCfcGfgagggscsu		AGCCCTCCGGAGACTACAGCCAG	
AD-1656372	usascagcCfaGfGfGfagugggcuL96		asAfsgccAfcAfCfuccUfgGfcuguasgsu		ACTACAGCCAGGGAGTGTGGCTC	
AD-1656383	asgsugugGfcUfCfCfagggaugguL96		asCfscauUfcCfCfuggaGfcCfacacuscsc		GGAGTGTGGCTCCAGGGAATGGG	
AD-1656392	csasucagCfuUfUfGfcuacugucauL96		asUfsgacAfgUfAfgcaaAfgCfugaugsasc		GTCATCAGCTTTGCTACTGTCAC	
AD-1656406	csusgucaCfaGfAfCfuccacuucuuL96		asUfsgaaGfuGfGfagucUfgUfgacagsusa		TACTGTCACAGACTCCACTTCAG	
AD-1656417	uscscacuUfcAfGfCfcuacagcucuL96		asGfsagcUfgUfAfggcuGfaAfguggasgsu		ACTCCACTTCAGCCTACAGCTCC	
AD-1656437	cscsugcuCfaCfUfUfuucaccuguuL96		asAfsagcGfuGfAfaaagUfgAfgcaggsgsa		TCCCTGCTCACTTTTCACCTGTC	
AD-1656449	uscscacuGfuCfCfAfcuccucgguuL96		asAfsccgAfgGfAfguggAfcAfggugasasa		TTTCACCTGTCCACTCCTCGGTC	
AD-1656468	uscscacCfaCfCfUfguaccaugcuL96		asGfscauGfgUfAfcaggUfgGfugggascsc		GGTCCCACCACCTGTACCATGCC	
AD-1656480	usascgauGfcCfCfGfccugggcuL96		asAfsgccAfcAfGfgggGfcAfgguascsa		TGTACCATGCCCCGCTGTGGCTG	
AD-1656492	cscscuucCfuGfGfCfacucuugcuL96		asGfscaaAfgAfGfugccAfgGfaaggsusg		CACCCTTCCTGGCACTCTTTGCT	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana de ARNm	SEQ ID NO:
AD-1656504	csuscuuuGfcUfUfGfaggauucuL96		asGfsaagAfuCfCfucaaGfcAfaagagsug		CACTCTTTGCTTGAGGATCTTCC	
AD-1656535	ascsucucCfuGfGfCfugagcacauL96		asUfsgguGfcUfCfagccAfgGfagagusgsc		GCACTCTCCTGGCTGAGCACCAC	
AD-1656547	gsasgcacCfaCfAfUfcaccaaccuuL96		asAfsrgguUfgGfUfgaugUfgGfugcucsasg		CTGAGCACCACATCACCAACCTG	
AD-1656559	ascscacCfuGfGfGfcuggcacuuL96		asGfsuauGfcCfAfgcccAfgGfuuggusgsa		TCACCAACCTGGGCTGGCATACC	
AD-1656570	csusggcaUfaCfCfUfuaacucugcuL96		asGfscagAfgUfUfaaggUfaUfgccagscsc		GGCTGGCATACCTTAACCTGACC	
AD-1656587	usgscccuCfuAfGfUfggcuugagguL96		asCfscucAfaGfCfcacuAfgAfgggcasgsa		TCTGCCCTCTAGTGGCTTGAGGG	
AD-1656591	asgsaaguCfuGfGfUfguccugaaauL96		asUfsuucAfgGfAfcaccAfgAfcuucscsa		TGAGAAGTCTGGTGTCTCTGAAAC	
AD-1656602	gsuscugAfaAfCfUfgcaacuagauL96		asUfscuaGfuUfGfcaguUfuCfaggacsasc		GTGTCCTGAAACTGCAACTAGAC	
AD-1656622	ascsgcaCfaGfUfUfacuggacaauL96		asUfsuguCfcAfGfuaacUfgUfgcugusug		CAACAGCACAGTTACTGGACAAC	
AD-1656634	csusggacAfaCfCfGfaggcggcucuL96		asGfsagcCfGfCfucggUfuGfuccagsusa		TACTGGACAACCGAGGCGGCTCT	
AD-1656647	gscsgguCfuUfGfGfacacagcaguL96		asCfsugcUfgUfGfuccaAfgAfgccgcscsu		AGGCGGCTCTTGACACAGCAGG	
AD-1656667	gsascaccAfgCfAfGfcccuccuauL96		asUfsaggAfaGfGfgcugCfuGfgugucscsu		AGGACACCAGCAGCCCTTCTAG	
AD-1656679	cscsuuccUfaGfAfGfcuaaagauL96		asGfsaucUfuAfAfgcucUfaGfgaaggsgsc		GCCCTTCTAGAGCTTAAGATCC	
AD-1656690	csusuagAfuCfCfGfagccaugauL96		asUfscuaUfgGfCfucggAfuCfuuaagscsu		AGCTTAAGATCCGAGCCAATGAG	
AD-1656701	asgsccaaUfgAfGfCfugggagcaguL96		asCfsugcUfcCfAfggcuCfaUfuggcuscsg		CGAGCCAATGAGCCTGGAGCAGG	
AD-1656716	asgsrgcaGfaCfCfAfuaacguagauL96		asUfscuaCfGfUfauggUfcUfgccusgsc		GCAGGCGAGACCATTACGTAGAC	
AD-1656728	usascguaGfaCfUfUfccaggaacuuL96		asAfsuuCfcUfGfgaagUfcUfacguasasu		ATTACGTAGACTTCCAGGAACTG	
AD-1656740	csasggaaCfuGfGfGfauggcgggauL96		asUfscuuGfcCfAfuccaAfgUfuccugsgsa		TCCAGGAACTGGGATGGCGGGAC	
AD-1656754	gscsgggaCfuGfGfAfuaucgagcuL96		asGfscugCfaGfUfauccAfgUfcccgcscsa		TGGCGGGACTGGATACTGCAGCC	
AD-1656762	usascagCfuGfAfAfuaucgagcuL96		asCfsugcAfgUfAfauucAfgCfugguascsc		GGTACCAGCTGAATTACTGCAGT	
AD-1656775	ascsgcaGfuGfGfGfcagugccuuL96		asAfsrggCfaCfUfgcccAfcUfgcagusasa		TTACTGCAGTGGGCAGTGCCTCTC	
AD-1656792	csasggcaUfuGfCfUfgccucuuuL96		asGfsaaaGfaGfGfcagCfaUfgccugsgsg		CCCAGGCATTGCTGCCTCTTCC	
AD-1656808	ususuccaUfuCfUfGfccgucuuauL96		asUfsgaaGfaCfGfgcagAfaUfggaaasgsa		TCTTTCCATTCTGCCGTCTTCAG	
AD-1656820	csgsucuuCfaGfCfCfuccucaaaguL96		asCfsuuuGfaGfGfaggcUfgAfagacsgsc		GCCGTCTTCAGCCTCCTCAAAGC	
AD-1656832	cscsucaaAfgCfCfAfacaauccuuuL96		asAfsaggAfuUfGfuuggCfuUfugaggsasg		CTCCTCAAAGCCAACAATCCTTG	
AD-1656849	csusggcCfuGfCfCfaguaccuccuL96		asGfsgagGfuAfCfuggcAfgGfccaagsgsa		TCCTTGGCCTGCCAGTACCTCCT	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana de ARNm	SEQ ID NO:
AD-1656862	usascucCfuGfUfUfguguccuauL96		asUfsaggGfaCfAfcaacAfgGfagguascsu		AGTACCTCCTGTTGTGTCCCTAC	
AD-1656873	gsusguccCfuAfCfUfgccccgaagguL96		asCfscuuCfGfGfGfcaguAfgGfGacacsasa		TTGTGTCCCTACTGCCCCAAGGC	
AD-1656876	csuscucuCfuCfCfUfcuaccuggauL96		asUfsccaGfgUfAfgaggAfgAfgagagsgsg		CCCTCTCTCTCCTCTACCTGGAT	
AD-1656888	usascugGfaUfCfAfuaauggcauL96		asUfsugcCfaUfUfaugaUfcCfagguasgsa		TCTACCTGGATCATAATGGCAAT	
AD-1656900	asasuggcAfaUfGfUfggucaagacuL96		asGfsucuUfgAfCfcacaUfuGfccauusasu		ATAATGGCAATGTGGTCAAGACG	
AD-1656915	asasgacGfaUfGfUfgccagauauL96		asAfsuauCfuGfGfcacaUfcCfugucuusgsa		TCAAGACGGATGTGCCAGATATG	
AD-1656926	gscscagaUfaUfGfGfugguggagguL96		asCfscucCfaCfCfaccuUfaUfcuggcsasc		GTGCCAGATATGGTGGTGGAGGC	
AD-1656942	gsasggccUfgUfGfGfcugcagcuauL96		asUfsagcUfgCfAfgccaCfaGfgccucscsa		TGGAGGCCTGTGGCTGCAGCTAG	
AD-1656954	usgscagcUfaGfCfAfagaggaccuuL96		asAfsggcCfcUfCfuugcUfaGfcugcasgsc		GCTGCAGCTAGCAAGAGGACCTG	
AD-1656958	csusuuggAfgUfGfAfagagaccauL96		asUfsuggUfcUfCfuucaCfuCfcaaagscsc		GGCTTTGGAGTGAAGAGACCAAG	
AD-1656969	asgsagacCfaAfGfAfugaaguuuuL96		asGfsaaaCfuUfCfaucuUfgGfucucususc		GAAGAGACCAAGATGAAGTTTCC	
AD-1656996	csasgggcAfuCfUfGfugacuggaguL96		asCfsuccAfgUfCfagacAfuGfccucgsusg		CACAGGGCATCTGTGACTGGAGG	
AD-1657013	gsasggcaUfcAfGfAfuuccugauL96		asGfsaucAfgGfAfaucuGfaUfgccucscsa		TGGAGGCATCAGATTCCTGATCC	
AD-1657022	ascscacCfaAfCfCfaccuggcauL96		asUfsugcCfaGfGfugguUfgUfugggusug		CAACCAACAACCACCTGGCAAT	
AD-1657037	gsgscaauAfuGfAfCfucacuugacuL96		asGfsucaAfgUfGfagucAfuAfuugccsasg		CTGGCAATATGACTCACTTGACC	
AD-1657045	gsascccaAfaUfGfGfgcacuuuuuL96		asAfsгааAfgUfGfcccaUfuUfgggucscsc		GGGACCCAAATGGGCACCTTTCTT	
AD-1657058	ascsuuucUfuGfUfCfugagacucuuL96		asAfsagcUfcUfCfagacAfaGfaaagusgsc		GCACTTTCTTGTCTGAGACTCTG	
AD-1657069	usgsagacUfcUfGfGfcuuauuccauL96		asUfsaggAfuAfAfgccaGfaGfucucasgsa		TCTGAGACTCTGGCTTATTCCAG	
AD-1657085	uscscaggUfuGfGfCfugauguguuuL96		asAfsacaCfaUfCfagccAfaCfcuggasasu		ATTCCAGGTTGGCTGATGTGTTG	
AD-1657099	usgsuguuGfgGfAfGfauggguuuuL96		asUfsuuuAfcCfAfucucCfcAfacacasusc		GATGTGTTGGGAGATGGGTAAAG	
AD-1657113	gsgsuuuuGfcGfUfUfucuuuuuuL96		asUfsuuuGfaAfGfaaacGfcUfuuaaccscsa		TGGGTAAAGCGTTTCTTCTAAAG	
AD-1657119	usascccaGfaAfAfGfcauguuuuuL96		asGfsaaaUfcAfUfgcuUfcUfggguasgsa		TCTACCCAGAAAGCATGATTTCC	
AD-1657133	gsasuucCfuGfCfCfuaaguccuuL96		asAfsaggCfuUfAfgggcAfgGfaaacsasu		ATGATTTCTGCTGCTAAGTCCTG	
AD-1657147	asgsuccuGfuGfAfGfaagauuL96		asUfsagcAfuCfUfucucAfcAfggacususa		TAAGTCCTGTGAGAAGATGTCAG	
AD-1657164	uscsagggAfcUfAfGfgaggaggguL96		asCfscucCfcUfCfccuGfuCfcugascsa		TGTCAGGGACTAGGGAGGGAGGG	
AD-1657185	asasuacUfuAfGfCfcucucccauL96		asUfsuggGfaGfAfggcuAfaGfuauususu		AAAATTACTTAGCCTCTCCCAAG	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana de ARNm	SEQ ID NO:
AD-1657202	csasagauGfaGfAfAfaguccucaaL96		asUfsugaGfgAfCfuuuUfcAfucuuugsgsg		CCCAAGATGAGAAAGTCCTCAAG	
AD-1657211	gsgsaggaAfgCfAfGfauagauguuL96		asAfsccaUfcUfAfucugCfuUfccuccsusc		GAGGAGGAAGCAGATAGATGGTC	
AD-1657234	gscsagggUfuGfAfAfagcaggguaauL96		asUfsuacCfcUfGfcuucAfaGfccugcsusg		CAGCAGGCTTGAAGCAGGGTAAG	
AD-1657245	gscsagggUfaAfGfCfagggcugccuL96		asGfsgccAfgCfCfugcuUfaCfccugcsusu		AAGCAGGGTAAGCAGGCTGGCCC	
AD-1657261	gsgscccaGfgGfUfAfagggcuguuuL96		asAfsacaGfcCfCfuuacCfcUfgggccsasg		CTGGCCCAGGGTAAGGGCTGTTG	
AD-1657274	gsgscuguUfgAfGfGfuaccuuaaguL96		asCfsuuaAfgGfUfaccuCfaAfcagccscsu		AGGGCTGTTGAGGTACCTTAAGG	
AD-1657286	ascscuuaAfgGfGfAfaggucaagauL96		asUfscuuGfaCfCfuuccCfuUfaaggusasc		GTACCTTAAGGGAAGGTCAAGAG	
AD-1657299	gsuscaagAfgGfGfAfgaugggcaauL96		asUfsugcCfcAfUfcuccCfuCfuugacscsu		AGGTCAAGAGGGAGATGGGCAAG	
AD-1657322	gscsugagGfgAfGfGfaugcuuagguL96		asCfscuaAfgCfAfuccuCfcCfucagcsgsc		GCGCTGAGGGAGGATGCTTAGGG	
AD-1657324	asgsaaacAfgGfAfGfucagggaaaL96		asUfsuuuCfcUfGfacucCfuGfuuuucsgsg		CCAGAAACAGGAGTCAGGAAAAT	
AD-1657335	uscsaggaAfaAfUfGfaggcacuaauL96		asUfsuagUfgCfCfucuuUfuUfccugascsu		AGTCAGGAAAATGAGGCACTAAG	
AD-1657347	gsgscacuAfaGfCfCfuaagaaguuuL96		asAfsacuUfcUfUfagggUfuAfgugccsusc		GAGGCACTAAGCCTAAGAAGTTC	
AD-1657359	asasgaagUfuCfCfCfugguuuuuL96		asGfsaaaAfaCfCfagggAfaCfuucuuasag		CTAAGAAGTTCCTGGTTTTTCC	
AD-1657374	csascuggGfaGfAfCfaagcauuuauL96		asUfsaaaUfgCfUfugucUfcCfcagugsgsg		CCCACTGGGAGACAAGCATTTAT	
AD-1657385	asasgcauUfuAfUfAfcuuucuuuL96		asGfsaaaGfaAfAfguauAfaAfugcuusgsu		ACAAGCATTTATACCTTTCTTTCT	
AD-1657395	ususuugaGfaUfCfGfagucugcuuL96		asAfsugcgAfgAfCfucgaUfcUfcaaaasasa		TTTTTTTGAGATCGAGTCTCGCTC	
AD-1657410	uscsugcUfcUfGfUfcaccaggcuuL96		asAfsugcUfgGfUfgacaGfaGfcgagascsu		AGTCTCGCTCTGTCACCAGGCTG	
AD-1657431	asgsugcaGfuGfAfCfagcauuguL96		asCfsaagAfuCfGfugucAfcUfgcacuscsc		GGAGTGCAGTGACACGATCTTGG	
AD-1657446	gscsucacUfgCfAfAfccuccgucuuL96		asAfsugacGfgAfGfguugCfaGfugagcscsa		TGGCTCACTGCAACCTCCGTCTC	
AD-1657457	cscsuccgUfcUfCfCfuggguucaauL96		asUfsugaAfcCfCfaggaGfaCfaggagsusu		AACCTCCGTCTCCTGGGTTCAAG	
AD-1657463	ususcugcCfuCfAfGfccuccgaguL96		asCfsugcGfgAfGfgcugAfgGfcagaasgsa		TCTTCTGCCTCAGCCTCCCGAGC	
AD-1657475	usgsgguuCfaAfGfUfgauucuuuL96		asAfsгааGfaAfUfcacuUfgAfaccasgsg		CCTGGGTTCAAGTGATTCTTCTG	
AD-1657503	gsasgcagCfuGfGfGfauuacaggcuL96		asGfscuuGfuAfAfucccAfgCfugcucsgsg		CCGAGCAGCTGGGATTACAGGCG	
AD-1657520	csgscccaCfuAfAfUfuuuuguauuuL96		asAfsauaCfaAfAfaauUfgUfgggcgscsc		GGCGCCCACTAATTTTTGTATTC	
AD-1657529	usgsuauuUfuUfAfGfuagaacgauL96		asUfscguUfuCfUfacuaAfgAfauacasasa		TTTGTATTCTTAGTAGAAACGAG	
AD-1657540	usasgaaaCfGfGfuuucaacauuL96		asAfsuguUfgAfAfaccuCfGfuuucuascsu		AGTAGAAACGAGGTTTCAACATG	

Nombre dúplex	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana de ARNm	SEQ ID NO:
AD-1657552	ususcaacAfuGfUfUfggccaggauuL96		asAfsuccUfgGfCfcaacAfuGfuugaasasc		GTTTCAACATGTTGGCCAGGATG	
AD-1657564	cscsaggaUfgGfUfCfucaaucucuuL96		asAfsagAfuUfGfagacCfaUfccuggscsc		GGCCAGGATGGTCTCAATCTCTT	
AD-1657575	uscsaaucUfcUfUfGfaccucuugauL96		asUfscaaGfaGfGfucaaGfaGfauugasgsa		TCTCAATCTCTTGACCTCTTGAT	
AD-1657586	ascscucuUfgAfUfCfaccgcaguuL96		asAfsrucGfgGfUfggauCfaAfgagguscsa		TGACCTCTTGATCCACCCGACTT	
AD-1657600	cscsgacuUfgGfCfCfucccgaaguuL96		asAfsuuCfGfGfaggcCfaAfgucggsgsu		ACCCGACTTGGCCTCCCGAAGTG	
AD-1657615	gsasagugAfuGfAfGfauuauaggcuL96		asGfscuAfuAfAfucucAfuCfauucsgsg		CCGAAGTGATGAGATTATAGGCG	
AD-1657641	cscsuggcUfuAfUfAfcuuucuuauL96		asUfsuaaGfaAfAfguauAfaGfccaggscsg		CGCCTGGCTTATACTTTCTTAAT	
AD-1657653	gsasgaaaGfaAfAfAfuaacaaauL96		asAfsuuGfuUfGfauuuUfcUfuucucscsu		AGGAGAAAGAAAATCAACAAATG	
AD-1657674	usgsagucAfuAfAfAfgaaggguauL96		asUfsaacCfcUfUfcuuuAfuGfucascsa		TGTGAGTCATAAAGAAGGGTTAG	
AD-1657687	asgsgguuAfgGfGfUfgaugguccauL96		asUfsggaCfcAfUfcaccCfuAfaccususc		GAAGGGTTAGGGTGATGGTCCAG	
AD-1657704	cscsagagCfaAfCfAfguucuuaauL96		asUfsugaAfgAfAfcuguUfgCfucugsasc		GTCCAGAGCAACAGTTCTTCAAG	
AD-1657716	ususcuucAfaGfUfGfuacucuguauL96		asUfsacaGfaGfUfacacUfuGfaagaascsu		AGTTCTTCAAGTGTACTCTGTAG	
AD-1657727	usascucuGfuAfGfGfucucugggauL96		asUfscuAfgAfAfgccuAfcAfgaguascsa		TGTACTCTGTAGGCTTCTGGGAG	
AD-1657741	csusgggaGfgUfCfCfuuuucagguL96		asCfscugAfaAfAfgggaCfcUfccaggsa		TTCTGGGAGGTCCTTTTCAGGG	
AD-1657744	gsusccacAfaAfGfUfcaaagcuauuL96		asAfsuagCfuUfUfgacuUfuGfuggacsasc		GTGTCCACAAAGTCAAAGCTATT	
AD-1657760	csusaacaUfgUfUfAfuugccuuuuL96		asAfsaagGfcAfAfauaaCfaUfguuagsusa		TACTAACATGTTATTTGCCTTTT	
AD-1657776	csusuuugAfaUfUfCfucuuuauuuL96		asAfsgauAfaUfGfagaaUfuCfaaaagsgsc		GCCTTTTGAATTCTCATTATCTT	
AD-1657793	gsusauugUfgGfAfGfuuuuccagauL96		asUfscugGfaAfAfacucCfaCfaauacsasa		TTGTATTGTGGAGTTTCCAGAG	
AD-1657811	gsasggccGfuGfUfGfacaugugauuL96		asAfsucaCfaUfGfucacAfcGfgccusug		CAGAGGCCGTGTGACATGTGATT	
AD-1657822	ascsauguGfaUfUfAfcaucauuuL96		asAfsagaUfgAfUfguaaUfcAfauguscsa		TGACATGTGATTACATCATCTTT	
AD-1657834	asuscaucUfuUfCfUfgacaucuuuL96		asAfsaugAfuGfUfcagaAfaGfaugausgu		ACATCATCTTTCTGACATCATTG	
AD-1657845	gsascaucAfuUfGfUfuaauggaauuL96		asAfsuucCfaUfUfaacaAfuGfaugucsasg		CTGACATCATTTGTTAATGGAATG	

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos no modificados de agentes polinucleotídicos antisentido INHBE

Nombre del oligonucleótido	Secuencia antisentido no modificada de 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana 5' a 3'	SEQ ID NO:	Posición inicial en NM_031479.5	Posición final en NM_031479.5
ENST00000266646_1576	TGCCTTCCCTCCCTCCCTC C		GGAGGGAGGGAGGGAAGG CA		1576	1595
ENST00000266646_1255	GCCACAGGCCTCCACCAC CA		UGGUGGUGGAGGCCUGUG GC		1255	1274
ENST00000266646_466	AGCCACACTCCCTGGCTG TA		UACAGCCAGGGAGUGUGG CU		466	485
ENST00000266646_827	TCGGTTGTCCAGTAACTG TG		CACAGUUACUGGACAACC GA		827	846
ENST00000266646_1626	CCCTCACTTGAGGACTTT CT		AGAAAGUCCUCAAGUGAG GG		1626	1645
ENST00000266646_1000	GTCCCGCCATCCCAGTTC CT		AGGAACUGGGAUGGCGGG AC		1000	1019
ENST00000266646_1482	GCTTTACCCATCTCCCAA CA		UGUUGGGAGAUGGGUAAA GC		1482	1501
ENST00000266646_1648	ACCATCTATCTGCTTCCT CC		GGAGGAAGCAGAUAGAUG GU		1648	1667
ENST00000266646_1442	GCCAGAGTCTCAGACAA GAA		UUCUUGUCUGAGACUCUG GC		1442	1461
ENST00000266646_5	CCTCACAGCTCATGTCTG GC		GCCAGACAUGAGCUGUGA GG		5	24
ENST00000266646_1736	TTGCCCATCTCCCTCTTG AC		GUCAAGAGGGAGAUGGGC AA		1736	1755
ENST00000266646_1123	GGCTTTGAGGAGGCTGAA GA		UCUUCAGCCUCCUCAAAG CC		1123	1142
ENST00000266646_2390	TGTCACACGGCCTCTGGA AA		UUUCCAGAGGCCGUGUGA CA		2390	2409
ENST00000266646_269	GTGCTCGCACCAGTGCCC AC		GUGGGCACUGGUGCGAGC AC		269	288
ENST00000266646_293	AGGGACACACAGACCCT GTC		GACAGGGUCUGUGUGUCC CU		293	312

Nombre del oligonucleótido	Secuencia antisentido no modificada de 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana 5' a 3'	SEQ ID NO:	Posición inicial en NM_031479.5	Posición final en NM_031479.5
ENST00000266646_852	TGTCCTGCTGTGTCCAAGAG		CUCUUGGACACAGCAGGACA		852	871
ENST00000266646_1906	GACAGAGCGAGACTCGATCT		AGAUCGAGUCUCGCUCUGUC		1906	1925
ENST00000266646_773	GTTTCAGGACACCAGACTTC		GAAGUCUGGUGUCCUGAAAC		773	792
ENST00000266646_1606	CATCTTGGGAGAGGCTAAGT		ACUUAGCCUCUCCCAAGAUG		1606	1625
ENST00000266646_2235	ACTGTTGCTCTGGACCATCA		UGAUGGUCCAGAGCAACAUGU		2235	2254
ENST00000266646_1054	AGGGCACTGCCCAGTGCAGT		ACUGCAGUGGGCAGUGCCCU		1054	1073
ENST00000266646_385	GGTCAGGTGCAACCCATCCA		UGGAUGGGUUGCACCUGACC		385	404
ENST00000266646_1361	GGGTGTGGATCAGGAATCTG		CAGAUUCCUGAUCCACACCC		1361	1380
ENST00000266646_1547	GACATCTTCTCACAGGACTT		AAGUCCUGUGAGAAGAUGUC		1547	1566
ENST00000266646_905	GGCCTGCTCCAGGCTCATTG		CAAUGAGCCUGGAGCAGGCC		905	924
ENST00000266646_522	GCTGAAGTGGAGTCTGTGAC		GUCACAGACUCCACUUCAGC		522	541
ENST00000266646_2270	GGACCTCCCAGAAGCCTACA		UGUAGGCUUCUGGGAGGUCC		2270	2289
ENST00000266646_559	AGGAGTGGACAGGTGAAGAAG		CUUUUCACCUGUCCACUCCU		559	578
ENST00000266646_790	TCTGCAGTCTAGTTGCAGTT		AACUGCAACUAGACUGCAGGA		790	809
ENST00000266646_96	ACCCTTGGCCAAGGGTACAG		CUGUACCCUUGGCCAAGGUGU		96	115

Nombre del oligonucleótido	Secuencia antisentido no modificada de 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana 5' a 3'	SEQ ID NO:	Posición inicial en NM_031479.5	Posición final en NM_031479.5
ENST00000266646_2298	CTTTGACTTTGTGGACACC		GGGUGUCCACAAAGUCAAG		2298	2317
ENST00000266646_1221	GTCTTGACCACATTGCCATT		AAUGGCAAUGUGGUCAAGAC		1221	1240
ENST00000266646_172	CAGTTGCTCCGTCTGTTGAG		CUCAACAGACGGAGCAACUG		172	191
ENST00000266646_1422	AGTGCCCATTTGGGTCCCAT		AUGGGACCCAAAUGGGCAACU		1422	1441
ENST00000266646_2057	ACATGTTGAAACCTCGTTTC		GAAACGAGGUUUCAACAUGU		2057	2076
ENST00000266646_1149	GAGGTACTGGCAGGCCAAGG		CCUUGGCCUGCCAGUACCUC		1149	1168
ENST00000266646_352	GGCTAGCTCCAGCACCAGAG		CUCUGGUGCUGGAGCUAGCC		352	371
ENST00000266646_75	CACCTGTCTTCTATTGTCTG		CAGACAAUAGAAGACAGGUG		75	94
ENST00000266646_2252	CAGAGTACACTTGAAGAACT		AGUUCUUCAAGUGUACUCUG		2252	2271
ENST00000266646_1853	TGCTTGTCTCCAGTGGGTC		GACCCACUGGGAGACAAGCA		1853	1872
ENST00000266646_585	CGGGCATGGTACAGGTGTG		CACCACCUGUACCAUGCCCG		585	604
ENST00000266646_1323	GCCCTGTGCCTGGGAAACCT		AAGUUUCCCAGGCACAGGCG		1323	1342
ENST00000266646_204	GTGAATGGCCCTGGTTCAAG		CCUGAACCAGGGCCAUUCAC		204	223
ENST00000266646_1719	GACCTTCCCTTAAGGTACCT		AGGUACCUUAAGGGAAGGUC		1719	1738
ENST00000266646_239	GCCAGAGCTGGACATCAGGG		CCCUGAUGUCCAGCUCUGGC		239	258

Nombre del oligonucleótido	Secuencia antisentido no modificada de 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana 5' a 3'	SEQ ID NO:	Posición inicial en NM_031479.5	Posición final en NM_031479.5
ENST00000266646_1384	ATTGCCAGGTGGTTGTTGGG		CCCAACAACCACCUGGCAAU		1384	1403
ENST00000266646_1017	TCGGGCTGCAGTATCCAGTC		GACUGGAUACUGCAGCCCGA		1017	1036
ENST00000266646_113	ACACCACTGCCACACCTACC		GGUAGGUGUGGCAGUGGUGU		113	132
ENST00000266646_1753	CATCCTCCCTCAGCGCCTTG		CAAGGCGCUGAGGGAGGAUG		1753	1772
ENST00000266646_2197	ACTCACATTTGTTGATTTTC		GAAAAUCAACAAAUGUGAGU		2197	2216
ENST00000266646_2441	TACAAGCACACATTCCATTA		UAAUGGAAUGUGUGCUUGUA		2441	2460
ENST00000266646_1297	GGTCTCTTCACTCCAAAGCC		GGCUUUGGAGUGAAGAGACC		1297	1316
ENST00000266646_1272	TCCTCTTGCTAGCTGCAGCC		GGCUGCAGCUAGCAAGAGGA		1272	1291
ENST00000266646_1694	GCCCTTACCCTGGGCCAGCC		GGCUGGCCCCAGGGUAAGGGC		1694	1713
ENST00000266646_1786	TTTCCTGACTCCTGTTTCTG		CAGAAACAGGAGUCAGGAAGA		1786	1805
ENST00000266646_684	AGGAGAGTGCGGGACCCTTG		CAAGGGUCCCGCACUCUCCU		684	703
ENST00000266646_1674	TGCTTACCCTGCTTCAAGCC		GGCUUGAAGCAGGGUAAGCA		1674	1693
ENST00000266646_646	CCATCGGAAGATCCTCAAGC		GCUUGAGGAUCUUC CGAUGG		646	665
ENST00000266646_712	GCCCAGGTTGGTGATGTGTG		ACCACAUCACCAACCUGGGC		712	731
ENST00000266646_2351	AGATAATGAGAATTCAA AAG		CUUUUGAAUUCUCAUUUAUCU		2351	2370

Nombre del oligonucleótido	Secuencia antisentido no modificada de 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana 5' a 3'	SEQ ID NO:	Posición inicial en NM_031479.5	Posición final en NM_031479.5
ENST00000266646_2373	AAAACTCCACAATACAATT		AAAUUGUAUUGUGGAGUUUU		2373	2392
ENST00000266646_1197	TCCAGGTAGAGGAGAGAGAG		CUCUCUCUCCUCUACCUGGA		1197	1216
ENST00000266646_1175	GCCTTCGGGCAGTAGGGACA		UGUCCCUACUGCCCGAAGGC		1175	1194
ENST00000266646_1340	TGCCTCCAGTCACAGATGCC		GGCAUCUGUGACUGGAGGCA		1340	1359
ENST00000266646_44	GGCTGAAAGTAGATCATCTG		CAGAUGAUCUACUUUCAGCC		44	63
ENST00000266646_1463	ACATCAGCCAACCTGGAAATA		UAUUCCAGGUUGGCUGAUGU		1463	1482
ENST00000266646_444	CTCCGGAGGGCTCTGGTCAG		CUGACCAGAGCCCUCCGGAG		444	463
ENST00000266646_1103	CGGCAGAATGGAAAGAGGCA		UGCCUCUUUCCAUUCUGCCG		1103	1122
ENST00000266646_2124	ATCTCATCACTTCGGGAGGC		GCCUCCCGAAGUGAUGAGAU		2124	2143
ENST00000266646_2096	GTGGATCAAGAGGTCAAGAG		CUCUUGACCUCUUGAUCCAC		2096	2115
ENST00000266646_665	GGCGCCTCCTCCTTGGTC		GGGACCAAGGAGGAGGCGCC		665	684
ENST00000266646_2333	AGGCAAATAACATGTTAGTA		UACUAACAUGUUAUUUGCCU		2333	2352
ENST00000266646_976	GTCTACGTAATGGTCTCGCC		GGCGAGACCAUUACGUAGAC		976	995
ENST00000266646_942	GTCGCAGGCTCACAGGTGGG		CCCACCUGUGAGCCUGCGAC		942	961
ENST00000266646_733	GGGCAGAGTTAAGGTATGCC		GGCAUACCUUAACUCUGCC		733	752

Nombre del oligonucleótido	Secuencia antisentido no modificada de 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana 5' a 3'	SEQ ID NO:	Posición inicial en NM_031479.5	Posición final en NM_031479.5
ENST00000266646_1817	ACCAGGGAAC TTCTTAGG CT		AGCCUAAGAAGU UCCCUG GU		1817	1836
ENST00000266646_2161	AGAAAGTATAAGCCAGG CGC		GCGCCUGGCUUAUACUUU CU		2161	2180
ENST00000266646_496	AAAGCTGATGACCTCCTC CC		GGGAGGAGGUCAUCAGCU UU		496	515
ENST00000266646_604	GAGCACGTGCAGCCACA GGC		GCCUGUGGCUGCACGUGC UC		604	623
ENST00000266646_1872	AGAAGAAAGAAAGTATA AAT		AUUUAUACUUUCUUUCUU CU		1872	1891
ENST00000266646_1526	GGGCAGGAAATCATGCTT TC		GAAAGCAUGAUU UCCUGC CC		1526	1545
ENST00000266646_2217	CACCCTAACCTTCTTTA TG		CAUAAAGAAGGGU UAGGG UG		2217	2236
ENST00000266646_1238	CCATATCTGGCACATCCG TC		GACGGAUGUGCCAGAUAU GG		1238	1257
ENST00000266646_922	GGTCCTCCTCCTGGCCCG GC		GCCGGGCCAGGAGGAGGA CC		922	941
ENST00000266646_1079	TGCCTGGGCTGCCAGCCA GG		CCUGGCUGGCAGCCCAGG CA		1079	1098
ENST00000266646_23	TGGATAGCTGTGCTTGAC CC		GGGUCAAGCACAGCUAUC CA		23	42
ENST00000266646_2022	AATTAGTGGGCGCCTGTA AT		AUUACAGGCGCCACUAA UU		2022	2041
ENST00000266646_874	AAGCTCTAGGAAGGGCT GCT		AGCAGCCCUUCCUAGAGC UU		874	893
ENST00000266646_2414	TGTCAGAAAGATGATGTA AT		AUUACAUCAUCUUUCUGA CA		2414	2433
ENST00000266646_626	AAAGAGTGCCAGGAAGG GTG		CACCCUCCUGGCACUCUU U		626	645

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos modificadas de agentes polinucleotídicos antisentido INHBE

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_1576	(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176625.1	
ENST00000266646_1255	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceos)dAsdGsdGs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dAs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176626.1	
ENST00000266646_466	(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(m5dCs)dAs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTsdGsdGs(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Teos)(Aeo)	A-3176627.1	
ENST00000266646_827	(Teos)(m5Ceos)(Geos)(Geos)(Teos)dTsdGsdTs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGsdTsdAsdAs(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Teos)(Geo)	A-3176628.1	
ENST00000266646_1626	(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)dAs(m5dCs)dTsdTsdGsdAsdGsdGsdAs(m5dCs)(Teos)(Teos)(Teos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176629.1	
ENST00000266646_1000	(Geos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)dGs(m5dCs)(m5dCs)dAsdTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dAsdGs(Teos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176630.1	
ENST00000266646_1482	(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)(Teos)dAs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dAsdTs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176631.1	
ENST00000266646_1648	(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5dCs)dTsdAsdTs(m5dCs)dTsdGs(m5dCs)dTsdTs(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176632.1	
ENST00000266646_1442	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)dAsdGsdTs(m5dCs)dTs(m5dCs)dAsdGsdAs(m5dCs)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Aeos)(Aeo)	A-3176633.1	
ENST00000266646_5	(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)(Aeos)(m5dCs)dAsdGs(m5dCs)dTs(m5dCs)dAsdTsdGsdTs(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Geos)(m5Ceo)	A-3176634.1	
ENST00000266646_1736	(Teos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5dCs)dAsdTs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(Teos)(Teos)(Geos)(Aeos)(m5Ceo)	A-3176635.1	
ENST00000266646_1123	(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)dTsdGsdAsdGsdGsdAsdGsdGs(m5dCs)dTs(Geos)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Aeo)	A-3176636.1	

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_2390	(Teos)(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Aeos)(m5dCs)dAs(m5dCs)dGsdGs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)dTs(Geos)(Geos)(Aeos)(Aeos)(Aeo)	A-3176637.1	
ENST00000266646_269	(Geos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(m5dCs)dGs(m5dCs)dAs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGsdTsdGs(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceo)	A-3176638.1	
ENST00000266646_293	(Aeos)(Geos)(Geos)(Geos)(Aeos)(m5dCs)dAs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdGsdAs(m5dCs)(m5dCs)(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176639.1	
ENST00000266646_852	(Teos)(Geos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)dTsdGs(m5dCs)dTsdGsdTsdGsdTs(m5dCs)(m5dCs)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Aeos)(Geo)	A-3176640.1	
ENST00000266646_1906	(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)dAsdGs(m5dCs)dGsdAsdGsdAs(m5dCs)dTs(m5dCs)(Geos)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176641.1	
ENST00000266646_773	(Geos)(Teos)(Teos)(Teos)(m5Ceos)dAsdGsdGsdAs(m5dCs)dAs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGs(Aeos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176642.1	
ENST00000266646_1606	(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)dTsdGsdGsdGsdAsdGsdAsdGsdGs(m5dCs)(Teos)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Teo)	A-3176643.1	
ENST00000266646_2235	(Aeos)(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Teos)dTsdGs(m5dCs)dTs(m5dCs)dTsdGsdGsdAs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176644.1	
ENST00000266646_1054	(Aeos)(Geos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)dAs(m5dCs)dTsdGs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dAs(m5dCs)dTs(Geos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Teo)	A-3176645.1	
ENST00000266646_385	(Geos)(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Aeos)dGsdGsdTsdGs(m5dCs)dAsdAs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176646.1	
ENST00000266646_1361	(Geos)(Geos)(Geos)(Teos)(Geos)dTsdGsdGsdAsdTs(m5dCs)dAsdGsdGsdAs(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Geo)	A-3176647.1	
ENST00000266646_1547	(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5dCs)dTsdTs(m5dCs)dTs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdGs(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(Teos)(Teo)	A-3176648.1	
ENST00000266646_905	(Geos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dGs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGsdGs(m5dCs)dTs(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(Teos)(Geo)	A-3176649.1	
ENST00000266646_522	(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Geos)(Aeos)dAsdGsdTsdGsdGsdAsdGsdTs(m5dCs)dTs(Geos)(Teos)(Geos)(Aeos)(m5Ceo)	A-3176650.1	
ENST00000266646_2270	(Geos)(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dAsdGsdAsdAsdGs(m5dCs)(m5Ceos)(Teos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176651.1	

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_559	(Aeos)(Geos)(Geos)(Aeos)(Geos)dTsdGsdGsdAs(m5dCs)dAsdGsdGsdTsdGs(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Geo)	A-3176652.1	
ENST00000266646_790	(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)dAsdGsdTs(m5dCs)dTsdAsdGsdTsdTsdGs(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Teos)(Teo)	A-3176653.1	
ENST00000266646_96	(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dTsdGsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAsdAsdGsdGsdGs(Teos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(Geo)	A-3176654.1	
ENST00000266646_2298	(m5Ceos)(Teos)(Teos)(Teos)(Geos)dAs(m5dCs)dTsdTsdTsdGsdTsdGsdGsdAs(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176655.1	
ENST00000266646_1221	(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)dGsdAs(m5dCs)(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdTsdTsdGs(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(Teo)	A-3176656.1	
ENST00000266646_172	(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Teos)(Teos)dGs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dGsdTs(m5dCs)dTsdGs(Teos)(Teos)(Geos)(Aeos)(Geo)	A-3176657.1	
ENST00000266646_1422	(Aeos)(Geos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5dCs)(m5dCs)dAsdTsdTsdTsdGsdGsdGsdTs(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Teo)	A-3176658.1	
ENST00000266646_2057	(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(Geos)dTsdTsdGsdAsdAsdAs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(Geos)(Teos)(Teos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176659.1	
ENST00000266646_1149	(Geos)(Aeos)(Geos)(Geos)(Teos)dAs(m5dCs)dTsdGsdGs(m5dCs)dAsdGsdGs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Geo)	A-3176660.1	
ENST00000266646_352	(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Aeos)dGs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGs(m5dCs)dAs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Aeos)(Geo)	A-3176661.1	
ENST00000266646_75	(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dGsdTs(m5dCs)dTsdTs(m5dCs)dTsdAsdTsdTs(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Geo)	A-3176662.1	
ENST00000266646_2252	(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Aeos)(Geos)dTsdAs(m5dCs)dAs(m5dCs)dTsdTsdGsdAsdAs(Geos)(Aeos)(Aeos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176663.1	
ENST00000266646_1853	(Teos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)dGsdTs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dAsdGsdTs(Geos)(Geos)(Geos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176664.1	
ENST00000266646_585	(m5Ceos)(Geos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)dAsdTsdGsdGsdTsdAs(m5dCs)dAsdGsdGs(Teos)(Geos)(Geos)(Teos)(Geo)	A-3176665.1	
ENST00000266646_1323	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dGsdTsdGs(m5dCs)(m5dCs)dTsdGsdGsdGsdAs(Aeos)(Aeos)(m5Ceos)(Teos)(Teo)	A-3176666.1	

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_204	(Geos)(Teos)(Geos)(Aeos)(Aeos)dTsdGsdGs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTsdGsdGsdTs(Teos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Geo)	A-3176667.1	
ENST00000266646_1719	(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTsdTsdAsdAsdGsdGs(Teos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176668.1	
ENST00000266646_239	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)dAsdGs(m5dCs)dTsdGsdGsdAs(m5dCs)dAsdTs(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Geos)(Geo)	A-3176669.1	
ENST00000266646_1384	(Aeos)(Teos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5dCs)dAsdGsdGsdTsdGsdGsdTsdTsdGs(Teos)(Teos)(Geos)(Geos)(Geo)	A-3176670.1	
ENST00000266646_1017	(Teos)(m5Ceos)(Geos)(Geos)(Geos)(m5dCs)dTsdGs(m5dCs)dAsdGsdTsdAsdTs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176671.1	
ENST00000266646_113	(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)dAs(m5dCs)dTsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAs(m5dCs)dAs(m5dCs)(m5Ceos)(Teos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176672.1	
ENST00000266646_1753	(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)dTs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)dAsdGs(m5dCs)dGs(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)(Geo)	A-3176673.1	
ENST00000266646_2197	(Aeos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)(Aeos)(m5dCs)dAsdTsdTsdTsdGsdTsdTsdGsdAs(Teos)(Teos)(Teos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176674.1	
ENST00000266646_2441	(Teos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(Aeos)dGs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdTsdTs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(Teos)(Aeo)	A-3176675.1	
ENST00000266646_1297	(Geos)(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(m5dCs)dTsdTs(m5dCs)dAs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dAs(Aeos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176676.1	
ENST00000266646_1272	(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)dTsdTsdGs(m5dCs)dTsdAsdGs(m5dCs)dTsdGs(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176677.1	
ENST00000266646_1694	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dTsdAs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTsdGsdGsdGs(m5dCs)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176678.1	
ENST00000266646_1786	(Teos)(Teos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)dTsdGsdAs(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dTsdGsdTs(Teos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Geo)	A-3176679.1	
ENST00000266646_684	(Aeos)(Geos)(Geos)(Aeos)(Geos)dAsdGsdTsdGs(m5dCs)dGsdGsdGsdAs(m5dCs)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)(Geo)	A-3176680.1	
ENST00000266646_1674	(Teos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)dAs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTsdGs(m5dCs)dTsdTs(m5dCs)(Aeos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176681.1	

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_646	(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)dGsdGsdAsdAsdGsdAsdTs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5Ceos)(Aeos)(Aeos)(Geos)(m5Ceo)	A-3176682.1	
ENST00000266646_712	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)dGsdGsdTsdTsdGsdGsdTsdGsdAsdTs(Geos)(Teos)(Geos)(Geos)(Teo)	A-3176683.1	
ENST00000266646_2351	(Aeos)(Geos)(Aeos)(Teos)(Aeos)dAsdTsdGsdAsdGsdAsdAsdTsdTs(m5dCs)(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Geo)	A-3176684.1	
ENST00000266646_2373	(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Aeos)(m5Ceos)dTs(m5dCs)(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdTsdAs(m5dCs)(Aeos)(Aeos)(Teos)(Teos)(Teo)	A-3176685.1	
ENST00000266646_1197	(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)dGsdTsdAsdGsdAsdGsdGsdAsdGsdAs(Geos)(Aeos)(Geos)(Aeos)(Geo)	A-3176686.1	
ENST00000266646_1175	(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(Teos)(m5dCs)dGsdGsdGs(m5dCs)dAsdTsdAsdGs(Geos)(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176687.1	
ENST00000266646_1340	(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)(m5dCs)(m5dCs)dAsdTsdTs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdTsdGs(Aeos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176688.1	
ENST00000266646_44	(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(Geos)dAsdTsdAsdGsdTsdAsdTsdTs(m5dCs)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Geo)	A-3176689.1	
ENST00000266646_1463	(Aeos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(m5Ceos)dAsdTsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAsdTsdTs(m5dCs)(m5dCs)dTsTs(Geos)(Aeos)(Aeos)(Teos)(Aeo)	A-3176690.1	
ENST00000266646_444	(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Geos)dGsdAsdTsdGsdGs(m5dCs)dTs(m5dCs)dTsTs(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Aeos)(Geo)	A-3176691.1	
ENST00000266646_1103	(m5Ceos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Aeos)dGsdAsdTsdGsdGsdAsdTsdAsdTsdGs(Aeos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Aeo)	A-3176692.1	
ENST00000266646_2124	(Aeos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)dAsdTsdTs(m5dCs)dAs(m5dCs)dTsTs(m5dCs)dGsdGs(Geos)(Aeos)(Geos)(Geos)(m5Ceo)	A-3176693.1	
ENST00000266646_2096	(Geos)(Teos)(Geos)(Geos)(Aeos)dTs(m5dCs)dAsdTsdGsdAsdTsdGsdTs(m5dCs)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Aeos)(Geo)	A-3176694.1	
ENST00000266646_665	(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Geos)(m5Ceos)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dTsTsTsGs(Geos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176695.1	
ENST00000266646_2333	(Aeos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Aeos)dAsdTsdAsdTsdAs(m5dCs)dAsdTsdGsdTs(Teos)(Aeos)(Geos)(Teos)(Aeo)	A-3176696.1	

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_976	(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Teos)(Aeos)(m5dCs)dGsdTsdAsdAsdTsdGsdGsdTs(m5dCs)(Teos)(m5Ceos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176697.1	
ENST00000266646_942	(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Geos)(m5Ceos)dAsdGsdGs(m5dCs)dTs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdGs(Geos)(Teos)(Geos)(Geos)(Geo)	A-3176698.1	
ENST00000266646_733	(Geos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Aeos)dGsdAsdGsdTsdTsdAsdAsdGsdGsdTs(Aeos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176699.1	
ENST00000266646_1817	(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)dGsdGsdAsdAs(m5dCs)dTsdTs(m5dCs)dTsdTs(Aeos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176700.1	
ENST00000266646_2161	(Aeos)(Geos)(Aeos)(Aeos)(Aeos)dGsdTsdAsdTsdAsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAs(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Geos)(m5Ceo)	A-3176701.1	
ENST00000266646_496	(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)dTsdGsdAsdTsdGsdAs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5Ceos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176702.1	
ENST00000266646_604	(Geos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(Aeos)(m5dCs)dGsdTsdGs(m5dCs)dAsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAs(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Geos)(m5Ceo)	A-3176703.1	
ENST00000266646_1872	(Aeos)(Geos)(Aeos)(Aeos)(Geos)dAsdAsdAsdGsdAsdAsdAsdGsdTsdAs(Teos)(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Teo)	A-3176704.1	
ENST00000266646_1526	(Geos)(Geos)(Geos)(m5Ceos)(Aeos)dGsdGsdAsdAsdAsdTs(m5dCs)dAsdTsdGs(m5Ceos)(Teos)(Teos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176705.1	
ENST00000266646_2217	(m5Ceos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceos)dTsdAsdAs(m5dCs)(m5dCs)(m5dCs)dTsdTs(m5dCs)dTs(Teos)(Teos)(Aeos)(Teos)(Geo)	A-3176706.1	
ENST00000266646_1238	(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Teos)(Aeos)dTs(m5dCs)dTsdGsdGs(m5dCs)dAs(m5dCs)dAsdTs(m5Ceos)(m5Ceos)(Geos)(Teos)(m5Ceo)	A-3176707.1	
ENST00000266646_922	(Geos)(Geos)(Teos)(m5Ceos)(m5Ceos)dTs(m5dCs)(m5dCs)dTs(m5dCs)(m5dCs)dTsdGsdGs(m5dCs)(m5Ceos)(m5Ceos)(Geos)(Geos)(m5Ceo)	A-3176708.1	
ENST00000266646_1079	(Teos)(Geos)(m5Ceos)(m5Ceos)(Teos)dGsdGsdGs(m5dCs)dTsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGs(m5Ceos)(m5Ceos)(Aeos)(Geos)(Geo)	A-3176709.1	
ENST00000266646_23	(Teos)(Geos)(Geos)(Aeos)(Teos)dAsdGs(m5dCs)dTsdGsdTsdGs(m5dCs)dTsdTs(Geos)(Aeos)(m5Ceos)(m5Ceos)(m5Ceo)	A-3176710.1	
ENST00000266646_2022	(Aeos)(Aeos)(Teos)(Teos)(Aeos)dGsdTsdGsdGsdGs(m5dCs)dGs(m5dCs)(m5dCs)dTs(Geos)(Teos)(Aeos)(Aeos)(Teo)	A-3176711.1	

Nombre del oligonucleótido	Secuencias de oligonucleótidos modificadas 5' a 3'	Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	SEQ ID NO:
ENST00000266646_874	(Aeos)(Aeos)(Geos)(m5Ceos)(Teos)(m5dCs)dTsdAsdGsdGsdAsdAsdGsdGsdGs(m5Ceos)(Teos)(Geos)(m5Ceos)(Teo)	A-3176712.1	
ENST00000266646_2414	(Teos)(Geos)(Teos)(m5Ceos)(Aeos)dGsdAsdAsdAsdGsdAsdTsdGsdAsdT(Geos)(Teos)(Aeos)(Aeos)(Teo)	A-3176713.1	
ENST00000266646_626	(Aeos)(Aeos)(Aeos)(Geos)(Aeos)dGsdTsdGs(m5dCs)(m5dCs)dAsdGsdGsdAsdAs(Geos)(Geos)(Geos)(Teos)(Geo)	A-3176714.1	

Tabla 6. Detección ASO de dosis única para INHBE en células Hep3B

Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	INHBE/gapdh		INHBE/gapdh	
	10 nM		1 nM	
	media	SD	media	SD
A-3176625.1	51.192	0.603	93.091	1.689
A-3176626.1	8.059	1.115	74.766	2.605
A-3176627.1	27.184	2.748	104.884	7.820
A-3176628.1	26.400	5.420	99.186	3.441
A-3176629.1	21.365	4.263	92.178	4.841
A-3176630.1	18.348	4.143	85.238	3.977
A-3176631.1	31.065	2.242	82.673	5.501
A-3176632.1	21.348	3.882	91.270	19.564
A-3176633.1	23.428	0.452	85.927	1.955
A-3176634.1	58.174	2.250	86.680	14.990
A-3176635.1	30.935	1.635	107.367	12.928
A-3176636.1	30.134	2.879	108.501	12.691
A-3176637.1	41.079	1.351	110.259	4.245
A-3176638.1	45.650	1.952	104.804	5.896
A-3176639.1	49.022	2.092	110.324	11.820
A-3176640.1	36.498	3.768	101.611	4.682
A-3176641.1	18.946	3.360	91.703	3.943
A-3176642.1	43.043	2.396	102.505	13.448
A-3176643.1	58.410	4.227	114.161	17.325
A-3176644.1	22.435	2.392	85.204	4.508
A-3176645.1	40.724	3.082	98.422	13.411
A-3176646.1	34.737	3.564	87.302	6.244
A-3176647.1	47.141	1.009	92.879	6.005
A-3176648.1	47.229	2.001	80.127	19.028
A-3176649.1	103.484	4.492	95.801	3.731
A-3176650.1	62.530	4.346	103.113	21.362
A-3176651.1	33.491	1.963	97.878	33.861
A-3176652.1	46.682	2.328	90.505	5.212
A-3176653.1	46.690	3.856	95.193	2.577
A-3176654.1	81.803	2.870	96.571	4.973
A-3176655.1	23.367	2.439	89.955	3.694
A-3176656.1	50.621	4.052	96.567	5.424
A-3176657.1	43.979	2.624	98.563	1.943
A-3176658.1	33.114	2.710	88.088	4.503

Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	INHBE/gapdh		INHBE/gapdh	
	10 nM		1 nM	
	media	SD	media	SD
A-3176659.1	28.785	1.812	89.803	2.435
A-3176660.1	28.643	1.121	92.195	6.855
A-3176661.1	31.450	1.403	88.997	3.281
A-3176662.1	55.488	4.793	117.712	32.655
A-3176663.1	41.608	2.154	93.474	5.595
A-3176664.1	31.959	0.722	80.745	1.631
A-3176665.1	58.038	4.692	97.514	2.907
A-3176666.1	44.189	3.593	89.228	8.710
A-3176667.1	80.541	3.170	97.269	5.151
A-3176668.1	39.789	0.976	79.359	2.412
A-3176669.1	49.085	3.293	89.408	5.140
A-3176670.1	90.673	9.767	98.517	7.050
A-3176671.1	40.467	2.213	95.310	71.768
A-3176672.1	56.793	1.077	93.645	4.505
A-3176673.1	37.695	1.452	72.950	14.812
A-3176674.1	41.638	1.309	89.725	6.216
A-3176675.1	53.549	3.826	108.649	25.494
A-3176676.1	36.859	0.931	79.435	17.412
A-3176677.1	39.240	5.511	86.177	8.146
A-3176678.1	37.041	1.262	80.683	4.706
A-3176679.1	47.681	2.196	95.029	17.729
A-3176680.1	63.520	4.117	84.868	6.457
A-3176681.1	48.092	4.264	86.458	27.868
A-3176682.1	60.122	1.450	89.746	6.488
A-3176683.1	52.770	2.661	79.356	4.009
A-3176684.1	82.456	5.211	89.499	10.451
A-3176685.1	64.430	1.923	97.314	1.501
A-3176686.1	91.745	6.663	104.301	5.023
A-3176687.1	63.608	6.412	96.022	9.206
A-3176688.1	44.602	1.763	97.443	5.151
A-3176689.1	79.137	3.742	101.440	11.939
A-3176690.1	56.697	3.146	97.405	4.025
A-3176691.1	55.203	3.092	106.389	15.186
A-3176692.1	65.034	3.992	102.017	9.029
A-3176693.1	24.934	1.017	71.277	3.138
A-3176694.1	36.078	1.241	90.845	5.112

Nombre del oligonucleótido antisentido – Designación Alnylam	INHBE/gapdh		INHBE/gapdh	
	10 nM		1 nM	
	media	SD	media	SD
A-3176695.1	66.832	1.621	95.640	2.202
A-3176696.1	54.558	1.600	104.647	10.679
A-3176697.1	48.591	1.822	96.709	9.787
A-3176698.1	91.765	4.469	98.363	4.710
A-3176699.1	66.474	2.024	102.313	7.744
A-3176700.1	48.645	2.508	94.161	8.743
A-3176701.1	47.411	0.925	100.947	4.900
A-3176702.1	51.405	2.276	103.520	7.957
A-3176703.1	40.230	1.318	92.059	2.618
A-3176704.1	104.175	6.898	98.811	7.772
A-3176705.1	39.979	2.464	90.747	8.034
A-3176706.1	68.163	2.909	104.205	5.295
A-3176707.1	45.798	1.461	92.025	5.975
A-3176708.1	40.917	1.475	91.428	5.292
A-3176709.1	38.277	4.085	95.297	2.152
A-3176710.1	55.263	2.906	96.373	9.721
A-3176711.1	41.687	0.437	102.038	4.486
A-3176712.1	46.838	1.023	95.795	6.415
A-3176713.1	48.598	1.431	98.072	7.452
A-3176714.1	56.078	1.668	98.996	6.793

EQUIVALENTES

- Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente
- 5 experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones y métodos específicos descritos en el presente documento. Se pretende que dichos equivalentes queden abarcados por el alcance de las siguientes reivindicaciones.

Listado de secuencia informal

SEQ ID NO: 1

>NM_031479.5 Subunidad beta E (INHBE) de inhibina de Homo sapiens, ARNm

```
5 AGTAGCCAGACATGAGCTGTGAGGGTCAAGCACAGCTATCCATCAGATGATCTACTTTTCAGCCTTCCTGAGTCCC
AGACAATAGAAGACAGGTGGCTGTACCCTTGGCCAAGGGTAGGTGTGGCAGTGGTGTCTGCTGTCACTGTGCCCT
CATTGGCCCCCAGCAATCAGACTCAACAGACGGAGCAACTGCCATCCGAGGCTCCTGAACCAGGGCCATTACCA
GGAGCATGCGGCTCCCTGATGTCCAGCTCTGGCTGGTGTCTGTGGGCACTGGTGCAGACACAGGGGACAGGGT
10 CTGTGTGTCCCTCCTGTGGGGGCTCCAACTGGCACCCCAAGCAGAACGAGCTCTGGTGTGGAGCTAGCCAAGC
AGCAAATCCTGGATGGGTTGCACCTGACCAGTCGTCCCAGAATAACTCATCTCCACCCCAGGCAGCGCTGACCA
GAGCCCTCCGGAGACTACAGCCAGGGAGTGTGGCTCCAGGGAATGGGGAGGAGGTCATCAGCTTTGCTACTGTCA
CAGACTCCACTTCAGCCTACAGCTCCCTGCTCACTTTTCACCTGTCCACTCCTCGGTCCCACCACCTGTACCATG
CCCGCCTGTGGCTGCACGTGCTCCCCACCCCTTCTGGCACTCTTTGCTTGAGGATCTTCCGATGGGGACCAAGGA
GGAGGCGCAAGGGTCCCGCACTCTCCTGGCTGAGCACCACATCACCAACCTGGGCTGGCATACTTAACTCTGC
15 CCTCTAGTGGCTTGAGGGGTGAGAAGTCTGGTGTCTGAACTGCAACTAGACTGCAGACCCCTAGAAGGCAACA
GCACAGTTACTGGACAACCGAGGCGGCTCTTGGACACAGCAGGACACCAGCAGCCCTTCTAGAGCTTAAAGATCC
GAGCCAATGAGCCTGGAGCAGGCCGGGCCAGGAGGAGGACCCCCACCTGTGAGCCTGCGACCCCTTATGTTGCA
GGCGAGACCATTACGTAGACTTCCAGGAAGTGGGATGGCGGGACTGGATACTGCAGCCCGAGGGGTACCAGCTGA
ATTACTGCAGTGGGCAGTGCCCTCCCCACCTGGCTGGCAGCCAGGCATTGCTGCCTCTTTCCATTCTGCCGTCT
20 TCAGCCTCCTCAAAGCCAACAATCCTTGGCCTGCCAGTACCTCCTGTTGTGTCCCTACTGCCCGAAGGCCCTCT
CTCTCCTCTACCTGGATCATAATGGCAATGTGGTCAAGACGGATGTGCCAGATATGGTGGTGGAGGCCTGTGGCT
GCAGCTAGCAAGAGGACCTGGGGCTTTGGAGTGAAGAGACCAAGATGAAGTTTCCAGGCACAGGGCATCTGTGA
CTGGAGGCATCAGATTCTGATCCACACCCCAACCAACAACCACTGGCAATATGACTCACTTGACCCCTATGG
GACCCAAATGGGCACCTTTCTTGTCTGAGACTCTGGCTTATTCCAGGTTGGCTGATGTGTTGGGAGATGGGTAAAG
25 CGTTTCTTCTAAAGGGGTCTACCCAGAAAGCATGATTTCTGCCCTAAGTCTGTGAGAAGATGTCAGGGACTAG
GGAGGGAGGGAGGGAAGGCAGAGAAAAATTACTTAGCCTCTCCCAAGATGAGAAAAGTCTCAAGTGAGGGGAGGA
GGAAGCAGATAGATGGTCCAGCAGGCTTGAAGCAGGGTAAGCAGGCTGGCCCAGGGTAAGGGCTGTTGAGGTACC
TTAAGGGAAGGTCAAGAGGGAGATGGGCAAGGCGCTGAGGGAGGATGCTTAGGGGACCCCGAGAAACAGGAGTCA
GGAATGAGGCACTAAGCCTAAGAAGTTCCCTGGTTTTTCCAGGGGACAGGACCCACTGGGAGACAAGCATTT
30 ATACTTTCTTTCTTCTTTTTTATTTTTTGGAGATCGAGTCTCGCTCTGTCAACAGGCTGGAGTGCAGTGACACGA
TCTTGGCTCACTGCAACCTCCGTCTCCTGGGTCAAGTGAATCTTCTGCCTCAGCTCCCGAGCAGCTGGGATTA
CAGGCGCCCACTAATTTTTGTATTCTTAGTAGAAACAGAGTTTCAACATGTTGGCCAGGATGGCTCTTAATCTCTT
GACCTCTTGATCCACCCGACTTGGCCTCCCGAAGTGATGAGATTATAGGCGTGAGCCACCGCGCCTGGCTTATAC
TTTCTTAATAAAAAAGGAGAAAAGAAATCAACAAATGTGAGTCATAAAGAGGGTTAGGGTGATGGTCCAGAGCAA
35 CAGTTCTTCAAGTGTACTCTGTAGGCTTCTGGGAGGTCCCTTTTCAGGGGTGTCCACAAAGTCAAAGCTATTTTC
ATAATAATACTAACATGTTATTTGCCTTTTGAATTCTCATTATCTTAAATTTGTATTGTGGAGTTTTCCAGAGGC
CGTGTGACATGTGATTACATCATCTTTCTGACATCATTGTTAATGGAATGTGTGCTTGTA
```

40

SEQ ID NO: 2 COMPLEMENTO INVERSO DE SEQ ID NO: 1

```
TACAAGCACACATTCCATTAACAATGATGTGAGAAAGATGATGTAATCACATGTCACACGGCCTCTGGAAAAC
CCACAATACAATTTTAAGATAATGAGAATTCAAAAGGCCAAATAACATGTTAGTATTATTATGAAAATAGCTTTG
ACTTTGTGGACACCCCTGAAAAGGGACCTCCAGAAAGCCTACAGAGTACACTTGAAGAACTGTTGCTCTGGACC
45 ATCACCCCTAACCCCTTCTTTATGACTCACATTTGTTGATTTTCTTTCTCCTTTTTTATTAAGAAAGTATAAGCCAG
GCGCGGTGGCTCAGCCTATAATCTCATCACTTCGGGAGGCCAAGTCGGGTGGATCAAGAGGTCAAGAGATTGA
GACCATCCTGGCCAACATGTTGAAACCTCGTTTTCTACTAAGAATACAAAAATTAGTGGGCGCCTGTAATCCAG
CTGCTCGGGAGGCTGAGGCAGAAGAATCACTTGAACCCAGGAGACGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCGTGTCA
CTGCACTCCAGCCTGGTGACAGAGCGAGACTCGATCTCAAAAAAATAAAAAAGAAAGAAAGTATAAATGCT
50 TGTCTCCAGTGGGTCTGTCCCTGGGAAAAACAGGGAACTTCTTAGGCTTAGTGCCCTCATTTTCTGACTC
CTGTTTCTGGGGTCCCTAAGCATCCTCCCTCAGCGCCTTGCCCATCTCCCTCTTGACCTTCCCTTAAGGTAC
CTCAACAGCCCTTACCCTGGGCCAGCCTGCTTACCCTGCTTCAAGCCTGCTGGACCATCTATCTGCTTCCCTCCT
CCCCCTCACTTGAGGACTTTCTCATCTTGGGAGAGGCTAAGTAATTTTTCTCTGCCTTCCCTCCCTCCCTCCCTA
GTCCCTGACATTTCTCAGAGACTTAGGGCAGGAATCATGCTTTCTGGGTAGACCCCTTTAGAAGAAACGCT
55 TTACCCATCTCCCAACACATCAGCCAACCTGGAATAGCCAGAGTCTCAGACAAGAAAGTATTTGGGTCC
CATAGGGGTCAAGTGAGTCATATTGCCAGGTGGTTGTTGGGTGGGGTGTGGATCAGGAATCTGATGCCTCCAG
TCACAGATGCCCTGTGCCTGGGAACTTCATCTTGGTCTCTTCACTCCAAAGCCCCAGGTCTCTTGCTAGCTG
CAGCCACAGGCCTCCACCACCATATCTGGCACATCCGTCTTGACCACATTGCCATTATGATCCAGGTAGAGGAG
AGAGAGGGGCCTTCGGGCAGTAGGGACACAACAGGAGGTACTGGCAGGCCAAGGATTGTTGGCTTTGAGGAGGC
60 TGAAGACGGCAGAATGGAAAGAGGCAGCAATGCCTGGGCTGCCAGCCAGGTGGGGAGGGCACTGCCACTGCAG
TAATTACAGCTGGTACCCCTCGGGCTGCAGTATCCAGTCCCGCATCCAGTTCCTGGAAGTCTACGTAATGGTC
TCGCTGCAACATAAGGGGGTCGAGGCTCACAGGTGGGGTCTCCTCCTGCCCCGCGCTGCTCCAGGCTCAT
```

TGGCTCGGATCTTAAGCTCTAGGAAGGGCTGCTGGTGTCTGCTGTGTGCCAAGAGCCGCCTCGGTTGTCCAGTA
 ACTGTGCTGTTGCCTTCTAGGGGTCTGCAGTCTAGTTGCAGTTTCAGGACACCAGACTTCTCACCCCTCAAGCC
 ACTAGAGGGCAGAGTTAAGGTATGCCAGCCAGGTTGGTGATGTGGTGCTCAGCCAGGAGAGTGCGGGACCCCTT
 GCGCCTCCTCCTTGGTCCCCATCGGAAGATCCTCAAGCAAAGAGTGCCAGGAAGGGTGGGGAGCACGTGCAGC
 5 CACAGGCGGGCATGGTACAGGTGGTGGGACCGAGGAGTGACAGGTGAAAAGTGAGCAGGGAGCTGTAGGCTGA
 AGTGGAGTCTGTGACAGTAGCAAAGCTGATGACCTCCTCCCCATTCCCTGGAGCCACACTCCCTGGCTGTAGTC
 TCCGGAGGGCTCTGGTCAGCGCTGCCTGGGGTGGAGGATGAGTTATTCTGGGACGACTGGTCAGGTGCAACCCA
 TCCAGGATTTGCTGCTTGGCTAGCTCCAGCACCAGAGCTCGTTCTGCTTGGGGTGCCAGTTTGGAGCCCCCACA
 GGAGGGACACACAGACCCTGTCCCCTGTGCTCGCACCAGTGCCACAGCAGCACCAGCCAGAGCTGGACATCAG
 10 GGAGCCGCATGCTCCTGGTGAATGGCCCTGGTTTCAGGAGCCTCGGATGGCAGTTGCTCCGTCTGTTGAGTCTGA
 TTGCTGGGGGCCAATGAGGGCACAGTGACAGCAGACACCACTGCCACACCTACCCTTGGCCAAGGGTACAGCCA
 CCTGTCTTCTATTGTCTGGGACTCAGGAAGGCTGAAAGTAGATCATCTGATGGATAGCTGTGCTTGACCCCTCAC
 AGCTCATGTCTGGCTACT

SEQ ID NO: 3

>NM_008382.3 Mus musculus inhibina beta-E (Inhbe), ARNm

CAAGCAACTGGCTCTAAAGAGGCCCTGCCAGTAGTTAGTCATGAACTGTGAGGGTCACACATAGCTACCCACCA
 GGCGATCTACTCTCAGTCTTCTGAGTCCTAGGCTATTGAGGACAAGTAGCTTGGTCTGCTCTTTGTCAAGGGTA
 GCTGTGACACTGGTTTGTCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTT
 20 TGTATCCTCTTTGGGAAATCAGACTCATAAACTGCCACCCATTTCGAGGTTCTCAAAGCAGAGCCATCTACCTGG
 AGCATGAAGCTTCCAAAAGCCAGCTCTGGCTAATACTGCTGTGGGCATTGGTGTGGGTGCAGAGTACAAGACT
 GCGTGCCCGTCTGTGGGGGGCCCAACACTGGCACCCCAAGGAGAACGCGCTCTGGTCTTGAGCTAGCCAAGCAG
 CAAATCCTGGAGGGACTGCACCTAACCAGCCGTCCCAGAATAACTCGGCCTCTGCCCCAGGCAGCACTGACCAGA
 GCCCTCCGGAGACTGCAGCCCAAGAGCATGGTCCCTGGCAACCGAGAGAAAGTCATCAGCTTTGCTACCATCATA
 25 GACAAATCCACTTCAACCTACCGCTCCATGCTCACCTTCCAGCTGTCCCCCTCTTTGGTCCCACCACCTGTACCAT
 GCCCGCCTCTGGCTGCATGTGCCTCCCTCTTTTCCGGGCACTCTGTACCTGAGGATCTTCCGTTGCGGCACCACT
 AGGTGCCGAGGATTCCGCACCTTCTAGCTGAGCACCAAACTTCTCTGGCTGGCACGCCCTGACTCTGCCC
 TCTAGCGGCTTGCGGAGTGAGGACTCTGGCGTCGTGAACTCCAAGTGAATTTAGACCCCTGGACCTTAACAGC
 ACCGCTGCGGGACTGCCACGGCTGCTCTTGACACAGCGGGACAGCAACGTCCCTTCTTGGAACCTAAGATCCGA
 30 GCTAATGAACCTGGAGCAGGTGCGGCCAGGAGGAGGACTCCCACCTGTGAGCCTGAGACCCCTTATGTTGTAGG
 CGAGACCCTATGTAGACTTCCAGGAGCTGGGGTGGCGGGATTGGATCCTGCAGCCGAGGGATACCAGCTGAAT
 TACTGCAGTGGGCAGTGCCCCGCCCCACCTGGCTGGCAGTCCTGGCATTTGCTGCCTCCTTCCATTCTGCCGTCTTT
 AGCCTCCTCAAAGCCAACAACCCCTTGGCCTGCGGGTTCTTCTGCTGTGTCCCCACTGCACGAAGGCCTCTCTCT
 CTCCTCTACCTTGACCATAATGGCAATGTGGTCAAGACCGATGTGCCAGACATGGTAGTAGAGGCCTGTGGCTGC
 35 AGCTAGCAACAGGGCCTGAAGGTTCTGGGTGAAGTTCAAGGTTCAAGTTGGGGGTTCCACGTGCTGGAAGCTC
 GAGTTCCGGATCCATACTGACACCCAATAAGCTGTGTAGCAGTATGCCTGGGTTTGACCCCTATGGAACCTAAAT
 GGGCGTTTTCTTGTCCCAGATTCTGGCCTATTTTCAGGCTGTTTCAAATGTGGACAGATGGGTAAAGCGTTGCCTT
 TCAAGGGACTGCCTGGCCAGCACCATTTTCTACATCAAGCCCTGTTCCAGGACAGCAGGGATGCCGTGGGAGGGA
 AGGAAGAACACAGGGAGAAACTATTTAGTCTCTCCCGAGAAAGAAGTTCTCAAGTAATGAAGGCGGAAGTAGAA
 40 GGGTGGGCAGATTAGGAAAAGACAAACATACAGGCTAAGAACAGGGTGCAATTGCCTGCTTTGACAAAGGTCAAGAG
 GAAGAGGAGCAGGCGCCGAGGAAGGAGGGGTGTGCGGGTCCCTGGAATCGAGAATCAGTAAAAAGGGGTGCTGAA
 CTCGTAAGTTCTTAGGCTTCCCCCTCGAGGACAGGACCCACGCGGGTGACATACATTTTATATTTTCTTAATAAAA
 AAGGAGAAAGAAAAGCACCAGAGAATTGTGTAAGGGGTGTTAAAAATGGGCCAGAAAGCGAAGTGTGGTTTGGGGA
 CCTCTGTGCCCCAGCGGGTTTCTGAGACTTTCTCAGGGGTTTTCAAGACTATTTTCATAATCACACTGAGATGTT
 45 ATTTATCATTTGCTACCATTATCTTTACATTGTACAGTGGAACAGGGTGTGGTGGCTTACACTTATAACTACAG
 CACCGTGAGTTCAAGACCGGCCTTCATAGTGAATTC

SEQ ID NO: 4 COMPLEMENTO INVERSO DE SEQ ID NO: 3

GAATTCATATGAAGGCCGGTCTTGAACACCGTGCTGTAGTTATAAGTGTAAGCCACCACACCCTGTTCCAC
 TGTACAATGTAAAGATAATGGTAGCAAATGATAAATAACATCTCAGTGTGATTATGAAAATAGTCTTGAAAACCC
 CTGAGAAAGTCTCAGAAACCCGCTGGGGCACAGAGGTCCCCAAACCACACTTCGCTTCTGGCCATTTTAACAAC
 CCCTTACACAATTCTCTGGTGCTTTTCTTTCTCCTTTTTTATTAAGAAAATATAAAATGTATGTCACCCGCGTGGG
 55 TCCTGTCTCTGAGGGGGGAAGCCTAAGAACTTACGAGTTCAGCACCCTTTTTTACTGATTCTCGATTCCAGGGACC
 CCGACACCCCTCCTTCCCTCGGCGCCTGCTCCTCTTCTTCTTACCTTGTCAAAGCAGGCAATGCACCCCTGTTCTT
 AGCCTGTATGTTTGTCTTTTCTTAATCTGCCCACCCTTCTACTTCCGCCTTCATTACTTGAGGAACCTTTTCTC
 GGGAGAGACTAAATAGTTTCTCCCTGTGTTCTTCTTCCCTCCCACGGCATCCCTGCTGTCTGGAACAGGGCTT
 GATGTAGAAAATGGTGTGGCCAGGCAGTCCCTTGAAAGGCAACGCTTTACCCATCTGTCCACATTTGAAACAGC
 60 CTGAAATAGGCCAGAATCTGGGACAAGAAAACGCCCATTTAAGTTCCATAGGGGTCAAACCCAGGCATACTGCTA
 CACAGCTTATTGGGTGTGAGTATGGATCCGGAACCTGAGCTTCCAGACACGTGGGAACCCCACTTGAACCTTG
 AACTTCACCCAGAACCTTCAGGCCCTGTTGCTAGCTGCAGCCACAGGCCTCTACTACCATGTCTGGCACATCGGT
 CTTGACCACATTGCCATTATGGTCAAGGTAGAGGAGAGAGAGAGGGCCTTCGTGCAGTGGGGACACAGCAGGAAGA

ACCCGCAGGCCAAGGGTTGTTGGCTTTGAGGAGGCTAAAGACGGCAGAATGGAAGGAGGCAGCAATGCCAGGACT
 GCCAGCCAGGTGGGGCGGGCACTGCCCCTGACAGTAATTCAGCTGGTATCCCTCCGGCTGCAGGATCCAATCCCG
 CCACCCAGCTCCTGGAAGTCTACATAGTGGTCTCGCTACAACATAAGGGGGTCTCAGGCTCACAGGTGGGAGT
 CCTCCTCCTGGCCCCACCTGCTCCAGGTTTATTAGCTCGGATCTTAAGTTCCAAGAAGGGACGTTGCTGTCCCCG
 5 TGTGTCCAAGAGCAGCCGTGGCAGTCCCGCAGCGGTGCTGTTAAGGTCCAGGGGTCTAAATTCCAGTTGGAGTTT
 CACGACGCCAGAGTCTCCTACTCCGCAAGCCGCTAGAGGGCAGAGTCAGGGCGTGCCAGCCAGAGGAAGTGGTTTG
 GTGCTCAGCTAGGAAGGTGCGGAATCCTCGGCACCTAGTGGTGCCGCAACGGAAGATCCTCAGGTACAGAGTGCC
 CGGAAAAGAGGGAGGCACATGCAGCCAGAGGCGGGCATGGTACAGGTGGTGGGACCAAAGAGGGGACAGCTGGAA
 GGTGAGCATGGAGCGGTAGGTTGAAGTGGATTTGTCTATGATGGTAGCAAAGCTGATGACTTTCTCTCGGTTGCC
 10 AGGGACCATGCTCTTGGGCTGCAGTCTCCGGAGGGCTCTGGTCAGTGCTGCCTGGGGCAGAGGCCGAGTTATTCT
 GGGACGGCTGGTTAGGTGCAGTCCCTCCAGGATTTGCTGCTTGGCTAGCTCCAGGACCAGAGCGGTTCTCCTTG
 GGGTGCCAGTGTTGGGCCCCACAGGACGGGCACGCAGATCTTGTACTCTGCACCCACACCAATGCCCACAGCAG
 TATTAGCCAGAGCTGGGCTTTTGAAGCTTCATGCTCCAGGTAGATGGCTCTGCTTTGAGAACCCTCGAATGGGTG
 GCAGTTTTATGAGTCTGATTTCCCAAAGAGGATACAGAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
 15 GCAGCAGCAGCAGCAACAGCAAACAGTGTACAGCTACCCTTGACAAAGAGCAGACCAAGCTACTTGTCTCTCAA
 TAGCCTAGGACTCAGGAAGACTGAGAGTAGATCGCTTGGTGGGGTAGCTATGTGTGACCCTCACAGTTCATGACT
 AACTACTGGCAGGGCCTCTTTAGAGCCAGTTGCTTG

SEQ ID NO: 5

>NM_031815.2 Subunidad beta E (Inhbe) de inhibina de Rattus norvegicus, ARNm

ATGGGACTTTCAAATGTCCAGCTCTGGACAATACTGCTGTGGGCATTGGCATGAGGTACAAGATCTGCG
 TGCCCGTCTGTGGGGCCCCAACTCTGACACCCCCAAGGAGAACGCGCTCTGGTCTTAGAGCTAGCCAAGCAGCAA
 ATCCTGGAGGGGCTGCACCTAACCAGCCGTCCAGAAATAACTCGTCTCTGCCCCAGGCAGCACTGACCAGAGCC
 CTCCGGAGACTGCAGCCCAGGAGCATGGTCCCTGGCAACCGAGAGAAAAGTCATCAGCTTTGCTACCAGCATAGAC
 25 AAATCCACTTCAACCTACCGCTCCGTGCTCACCTTCCAAGTGTCCCTCTTTGGTCCCACCACCTGTACCATGCC
 CGCCTCTGGCTGCAGTGCCCCCTCTTTTCCGGCCACTCTGTATCTGAGGATCTTCGGTTGCGGTACCACGAGG
 TGCAGAGGATCCCGCACGTTCTTAGCTGATTACCAAACCACTTCTCCTCGGCTGGCACGCCCTGACTCTGCCCTCT
 AGCGGCTTGCGGAGTGAGGAATCTGGAGTCACAAAACCTCAACTGGAATTCAGACCTCTGGACCTTAACAGCACT
 ACTGCCAGACTGCCACGGCTGCTGTTGGACACAGCGGGACAGCAGCGTCCCTTCTTGAACTTAAGATCCGAGCT
 30 AATGAACCCGGAGCAGGCCGGGCCAGGAGGAGGACTCCACCTGTGAGTCTGAGACCCCTTATGTTGTAGACGA
 GACCACTATGTCGATTTCCAGGAGCTGGGGTGGAGAGACTGGATCCTGCAGCCGGAGGGATACCAGCTGAATTAC
 TGCAGTGGGCAGTGCCCGCCCCACCTGGCTGGCAGCCCTGGCATTGCTGCTTCTTCCATTCTGCTGTCTTTAGC
 CTCCTCAAAGCCAACAACCTTTGGCCTGCGGGTTCTTCTGCTGTGTCCCCACCGCGCAAGGCCCTCTCTCCCTC
 CTCTACCTTGACCATAATGGCAATGTGGTCAAGACCGATGTGCCAGACATGGTTGTAGAGGCCCTGTGGCTGCAGC
 35 TAG

SEQ ID NO: 6 COMPLEMENTO INVERSO DE SEQ ID NO: 5

CTAGCTGCAGCCACAGGCCTCTACAACCATGTCTGGCACATCGGTCTTGACCACATTGCCATTATGGTCAAGGTA
 40 GAGGAGGGAGAGAGGCCTTTCGCGCGGTGGGGACACAGCAGGAAGAACCCGCAGGCCAAGGGTTGTTGGCTTTGAG
 GAGGCTAAAGACAGCAGAATGGAAGGAAGCAGCAATGCCAGGGCTGCCAGCCAGGTGGGGCGGGCACTGCCCCT
 GCAGTAATTCAGCTGGTATCCCTCCGGCTGCAGGATCCAGTCTCTCCACCCCAGCTCCTGGAAATCGACATAGTG
 GTCTCGTCTACAACATAAGGGGGTCTCAGACTCACAGGTGGGAGTCTCTCTCTGGCCCCGGCCTGCTCCGGGTTT
 ATTAGCTCGGATCTTAAGTTCCAAGAAGGGACGCTGCTGTCCCGCTGTGTCCAACAGCAGCCGTGGCAGTCTGGC
 45 AGTAGTGCTGTTAAGGTCCAGAGGTCTGAATTCAGTTGGAGTTTGTGACTCCAGATTCTCTACTCCGCAAGCC
 GCTAGAGGGCAGAGTCAGGGCGTGCCAGCCGGAGGAAGTGGTTTGGTAATCAGCTAGGAACGTGCGGGATCCTCT
 GCACCTCGTGGTACCGCAACCGAAGATCCTCAGATACAGAGTGGCCGGAAGAGAGGGGGGCACGTGCAGCCAGAG
 GCGGGCATGGTACAGGTGGTGGGACCAAAGAGGGGACAGTTGGAAGGTGAGCACGGAGCGGTAGGTTGAAGTGGA
 TTTGTCTATGCTGGTAGCAAAGCTGATGACTTTCTCTCGGTTGCCAGGGACCATGCTCCTGGGCTGCAGTCTCCG
 50 GAGGGCTCTGGTCAGTGCTGCCTGGGGCAGAGGACGAGTTATTCTGGGACGGCTGGTTAGGTGCAGCCCCCTCCAG
 GATTTGCTGCTTGGCTAGCTCTAGGACCAGAGCGGTTCTCTTGGGGTGTGAGAGTTGGGGCCCCACAGGACGG
 GCACGCAGATCTTGTACTCTGCACCCATGCCAATGCCACAGCAGTATTGTCCAGAGCTGGACATTTGAAAGTCC
 CAT

SEQ ID NO: 7

>XM_001115958.3 PREDICTO: Subunidad beta E de inhibina de Macaca mulatta (INHBE), ARNm

AAATAAAATAAAATAAAATTTAAATTTCAAAAAGTTAAGAAAAAAGACCTGGCACTACTTCTAGGATGCCCCA
 AATTTAGGCAACTCTCACAGTCACTTGAAAGAGAAGTGGCAGCTGGGTATATGCCCTCCCAAGTGTATGCCCT
 60 TGACAGTCTGATGGACCCTGCCCTGTGCAAGATTGCATCACCACCACCACCCTCTCTGGGCTTCCCCAGACA
 TCACAGGAACACATTCCCCACCCCCAACCCCCCGCTCTGGCCCTCCTCCACATCATGCTGCAGGCCAACTGGACT
 CTGGGCGGCCAGACAGGCGAGGGTCAGGGGGTGACTTCTGTGCTCGTGGCACTGCCATCTGGGCTGAGCAAGA

